Untersuchungen über Nukleotid-sequenzunterschiede von 18 S rRNS und 28 S rRNS aus Rattenleber bei der chemischen Karzinogenese durch N-Nitrosomorpholin

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Hümpel

aus Lübeck

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0063

Untersuchungen über Nukleotid-sequenzunterschiede von 18 S rRNS und 28 S rRNS aus Rattenleber bei der chemischen Karzinogenese durch N-Nitrosomorpholin

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Hümpel

aus Lübeck

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	:	12. Juli 1974
Dekan	:	Prof. Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr.Dr. W. Frank
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Guglielmi

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Prof. Dr.Dr. W. Frank im Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, und im Institut für Medizinische Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Lübeck (Dir.: Prof. Dr. E. Harbers) durchgeführt.
Meinem Lehrer danke ich für die Zuweisung des Themas und die fachliche Diskussion während dessen Bearbeitung ebenso wie Herrn Prof. Dr.E. Harbers für die großzügige Unterstützung während der Arbeit in Lübeck.

Fräulein Ute Wischhöfer möchte ich für vielerlei technische Hilfen, die Herstellung der Gewebeschnitte und die Anfertigung der Spektren besonders danken.
Die graphischen Darstellungen und die Fotos besorgte Frau G. Wegener, der ich dafür danken möchte.
Viel Arbeit hatten auch die Herren H. Eßmann und J. Garus mit mir, die alle benutzten Elektrophoresegeräte und zusätzliche Laborgeräte nach Literaturangaben und eigenen Gedanken nachbauten.
Außerdem möchte ich für die Betreuung der Tierversuche Herrn D. Stachowiak Dank sagen.

Abkürzungen

P.A.A.	= Polyacrylamid
DEAE	= Diäthylaminoathyl
rRNS	= ribosomale Ribonukleinsäuren
S	= Svedberg (10^{-13} Sek.)
p-RNAse	= Ribonuklease aus Pankreas
T_1-RNAse	= Ribonuklease T_1 aus Aspergillus oryzae
S.F.	= Säurefuchsin
X.C.F.F.	= "Xylene Cyanol" F.F.
TRIS	= Tris(hydroxymethyl)aminomethan
L.S.C.	= Flüssigkeitsszintillationszähler
L.B.C.	= Tracerlab "low background counter"
UpM	= Umdrehungen pro Minute
CpM	= Zählimpulse pro Minute

Mononukleotide:

CMP = Cp = C	= Cytidin-3'-monophosphat
AMP = Ap = A	= Adenosin-3'-monophosphat
GMP = Gp = G	= Guanosin-3'-monophosphat
UMP = Up = U	= Uridin-3'-monophosphat

Dinukleotide:

AC = ApCp
GC = GpCp
AU = ApUp
GU = GpUp
CG = CpGp
AG = ApGp
UG = UpGp

Trinukleotide: entsprechend

N.B.	= Nukleotidbereiche
NNM	= N-Nitrosomorpholin
DMNA	= Dimethylnitrosamin
DÄNA	= Diäthylnitrosamin

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung
2.	Material und Methoden
2.1.	Material
2.1.1.	Chemikalien
2.1.2.	Lösungen
2.1.3.	Geräte
2.2.	Methoden
2.2.1.	Markierung mit ^{32}P und N-Nitrosomorpholinfütterung
2.2.2.	Isolierung der rRNS
2.2.3.	Isolierung der rRNS Arten
2.2.4.	Enzymatische Abbauten der 18 S- und 28 S-RNS
2.2.5.	Alkalische Hydrolysen
2.2.6.	DEAE-Sephadexsäulen
2.2.7.	Entsalzung und Isolierung der Nukleotide
2.2.8.	Hochspannungspapierelektrophoresen
2.2.9.	Ionophorese mit DEAE-Papier
2.2.10.	Plattengelelektrophorese (P.A.A.)
2.2.11.	Rundgelelektrophorese (P.A.A.)
2.2.12.	Autoradiogramme
2.2.13.	Nukleotidanalysen
2.2.13.1.	Elution der Nukleotide aus 3 MM Papier
2.2.13.2.	Elution der Nukleotide aus DEAE-Papier
2.2.13.3.	Alkalische Hydrolysen
2.2.13.4.	Phosphodiesteraseabbau
2.2.14.	Methoden der Auswertung
2.2.14.1.	DEAE Sephadexsäulen
2.2.14.2.	Elektrophoresepapiere
3.	Ergebnisse
3.1.	Ergebnisse der N-Nitrosomorpholinfütterung und Darstellung der durchgeführten Versuche
3.2.	Ergebnisse der Rohrzuckerdichtegradienten-zentrifugationen
3.3.	Verlauf der Ausbeuten der rRNS und der spezifischen Aktivitäten der 18S und 28S rRNS
3.4.	Diskussion von Gewebeschnitten

3.5. Ergebnisse der Mononukleotidanalysen

3.5.1. Mononukleotidgehalte der in Abb. 1 beschriebenen Bereiche

3.5.2. Mononukleotide des Abbaus mit p-RNAse

3.6. Ergebnisse der DEAE Sephadexauftrennungen der drei Abbauwege

3.6.1. Auftrennungen der T_1-RNAse-Hydrolysate auf DEAE Sephadexsäulen

3.6.2. Auftrennungen der p-RNAse-Hydrolysate auf DEAE Sephadexsäulen

3.6.3. Auftrennungen der alkalischen Hydrolysate von 18S und 28S rRNS auf DEAE Sephadexsäulen

3.7. Ergebnisse der Dinukleotidanalysen

3.7.1. Dinukleotidanalysen des T_1-RNAse-Abbaus

3.7.2. Dinukleotidanalysen des p-RNAse-Abbaus

3.7.3. Darstellung der alkalistabilen Dinukleotide

3.8. Ergebnisse der Trinukleotidanalysen

3.8.1. Trinukleotidanalysen des T_1-RNAse-Abbaus

3.8.2. Trinukleotidanalysen des p-RNAse-Abbaus

3.9. Ergebnisse der Tetranukleotidanalysen

3.10. Autoradiogramme der Plattengelelektrophoresen

3.11. Ergebnisse eines kinetischen Experimentes (X)

3.12. Isolierung von unbekannten Nukleotiden und deren spektrale Analyse

3.13. Ergebnisse der Analysen von einzelnen Nukleotidbereichen der Dinukleotidauftrennungen

3.14. Fehlerbetrachtung

3.14.1. Enzymatische Arbeiten

3.14.2. Zufuhr des Karzinogens

3.14.3. Aufarbeitung und Analytik

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse

4.1.1. Verlauf der spez. Aktivitäten

4.1.2. Ergebnisse der Mononukleotidanalysen und der alkalischen Hydrolysen

4.1.3. Ergebnisse der Di- und Trinukleotidanalysen

4.1.4. Ergebnisse der P.A.A.-Plattengelelektrophoresen

4.1.5. Zeitabhängigkeit der Veränderungen und Versuch X

4.2. Stoffwechsel des NNM und ein möglicher Bezug zu den vorgelegten Ergebnissen

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

Lebenslauf

1. Einleitung und Fragestellung

Die Entwicklung von neuen Techniken und Methoden zur Analytik von Ribonukleinsäuren (1)(2) hat zu vielen Untersuchungen der verschiedenen zellulären Ribonukleinsäuren bei Eukaryonten geführt. Die Untersuchungen erstreckten sich einerseits auf nukleoläre RNS und ihren Zusammenhang mit der zytoplasmatischen rRNS (3)(4)(5), andererseits auf die strukturellen Unterschiede zwischen nukleolärer Vorstufen-RNS und zytoplasmatischer rRNS von Tumorzellen (Novikoff Hepatom u.a.) und Normalzellen (6)(7)(8)(9).

Hierbei zeigte sich, daß zwei der drei ribosomalen Ribonukleinsäuren (18 S rRNS und 28 S rRNS) durch den Abbau einer im Nukleolus gebildeten hochmolekularen 45 S RNS entstehen (10). Unterschiede im Oligonukleotidgehalt von 45 S RNS, 18 S rRNS und 28 S rRNS aus Tumorzellen gegenüber Normalzellen wiesen hin auf ein verändertes Genprodukt für rRNS in Tumorzellen (6). Untersuchungen mit der Hybridisierungstechnik haben gezeigt, daß die genetische Information für die 45 S RNS bei diploiden Säugerzellen vielfach vorliegt (10^2 - 10^3fach) (4). Über die Einheitlichkeit dieser Strukturgene und deren Regulation liegen bislang keine gesicherten Ergebnisse vor. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, daß diese Unterschiede im genetischen Ausdruck durch Unterschiede in den vielfach vorhandenen rRNS Strukturgenen bedingt sind (11), es sich hierbei also möglicherweise um eine Transkription von anderem, nicht aber von verändertem genetischem Material handelt.

Ein direkter Zusammenhang zwischen den Unterschieden in der Primärstruktur der rRNS aus Tumorzellen und aus Normalzellen und der Ausbildung des Tumors muß auch schon deshalb nicht bestehen, da es Hinweise auf Unterschiede in der Primärstruktur von rRNS verschiedener Organe eines Tieres gibt (12).
Bei der chemischen Karzinogenese, bei der das Karzinogen u.a. das genetische Material direkt angreift, und die Vielzahl der Strukturgene der rRNS diesen Effekt noch verstärken sollte, erscheint der kausale Zusammenhang von Karzinogenese und Nukleotidsequenzunterschieden eher möglich. Von den acht bekannten Gruppen, in die die chemischen Karzinogene eingeordnet werden können (13), müssen vier Stoffgruppen enzymatisch aktiviert werden, um "in vivo" karzinogen wirken zu können. Zu diesen Stoffgruppen gehört eine Vielzahl von N-Nitrosoverbindungen, die in Abhängigkeit von Höhe und Dauer der Dosierung Karzinome bei Ratten hervorrufen. Die Struktur (bzw. die Möglichkeit von Zelltypen die Struktur durch Stoffwechselwege zu verändern) der N-Nitrosoverbindungen bestimmt außerdem den Wirkungsort, wobei die meisten symmetrisch substituierten Nitrosamine sowie einige heterozyklische N-Nitrosoverbindungen zur Bildung von Leberkrebs führen (14).
Die eigentliche "karzinogene Reaktion" sollte jedoch für alle Substanzen dieser Stoffgruppe einheitlich sein und in der Bildung von Diazoalkanen und anschließender Alkylierung von Nukleinsäuren und Proteinen liegen (13). Für Dimethylnitrosamin konnte dieses Wirkungsschema durch den Nachweis der Bildung von N^7-Methylguanin auch bewiesen werden (15, 16). Wie Rajewsky und Goth (50) am Beispiel des N-Äthyl-N-Nitrosoharnstoffs zeigen konnten, findet auch eine Sauerstoffalkylierung der Purinbasen statt (O^6-Äthylguanin). Nach Rajewsky und Goth soll die organ-

spezifische Wirkung des Karzinogens (Nervensystem der Ratte) auf die reduzierte Möglichkeit der Gehirnzellen zurückzuführen sein, das O^6-Äthylguanin (und andere O-Purinderivate) der DNS wieder in die unsubstituierte Base umzuwandeln.

Die Übertragung des Stoffwechselweges der Diazoalkanbildung auf heterozyklische N-Nitrosoverbindungen hat jedoch zuerst Bedenken (17), dann Ablehnung erfahren (18, 19).

Besonders zwei Gründe zwingen dazu, das Wesen der "karzinogenen Reaktion"neu zu überdenken:

a) eine N- oder O-Äthylierung oder Methylierung von Nukleinsäuren durch heterozyklische Nitrosamine konnte nicht festgestellt werden (19) - im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (22) und

b) der Indikator für Alkylierungen durch N-Nitrosoverbindungen, N^7-Methylguanin, konnte nach Applikation von Dimethylnitrosamin in vergleichbarer Konzentration sowohl in vom Tumor befallenen wie in nicht angegriffenen Organen nachgewiesen werden (18, 20, 21).

Um die für die karzinogene Wirkung der Nitrosamine anscheinend unwesentliche Reaktion der N-Alkylierung von Nukleinsäuren auszuschalten (siehe aber O-Alkylierung von Raj. u. Goth), wurde in der vorliegenden Arbeit das heterozyklische Karzinogen N-Nitrosomorpholin (NNM), das bei Ratten Leberkarzinome hervorruft, verwendet (23). Untersucht wurden die Nukleotidsequenzunterschiede von 18S rRNS und 28S rRNS aus Rattenleber von mit N-Nitrosomorpholin behandelten gegenüber unbehandelten Ratten unter Verwendung des Radioisotopes ^{32}P als Orthophosphat, das bei der Biosynthese die rRNS durch den statistischen Einbau in die Vorstufen "in vivo" markierte.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Es wurden bezogen:

von der Fa. Serva, Heidelberg

Acrylamid

N, N'-Methylenbisacrylamid

SDS (Na-Dodecylsulfat)

TMED (N,N,N',N'-Tetramethylenbisacrylamid)

Saccharose (ribonukleasefrei)

DEAE-Ionenaustauschpapier (45 + 55 cm)

von der Fa. Pharmacia, Uppsala (Schweden)

DEAE-Sephadex A25

von der Fa. Merck A.G., Darmstadt

Ribonuklease aus Pankreas (f. bioch. Zwecke, 20 U/mg)

sowie alle nicht genannten Chemikalien

von der Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig

^{32}Orthophosphat für jeden Versuchsansatz mit vorberechneter Aktivität (20 mCi/1 ml verd. HCl pH 2-3) für den Zeitpunkt der Injektion

von der Fa. Esso A.G., Hamburg

Varsol 60 als Schenkung

von der Fa. Agfa-Gevaert

Röntgenfilme 30 + 40 cm Curix RP 1

von der Fa. Boehringer, Mannheim

Phosphodiesterase aus Kälbermilz f. anal. Zwecke 2 U/mg

Ribonuklease T_1 aus Aspergillus oryzae f. anal. Zwecke 500 000 U/mg

alkalische Phosphatase (Kälberdarm) f. anal. 7 ecke 450 U/mg

RNS (Hefe)

von der Fa. Schwab-Reagenzien, Willmar-Lumenau

Säurefuchsin, Xylene Cyanol F.F., Methylorange, Orange G

von der Fa. Fluka A.G., Buchs (Schweiz)

N-Nitrosomorpholin, rein

von der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel

Elektrophoresepapier Sorte 2316 (entspr. Whatman 3 MM)

im Sonderzusschnitt 30 + 800 mm

300 + 800 mm

Von [illegible] f. Versuchstierzucht, Hannover

weibliche Wistarratten, die zu Fütterungsbeginn 160-180 g wogen.

2.1.2. Lösungen

Homogenisierungspuffer: (23)

0,25 m Sucrose

0,035 m TRIS

0,010 m $MgCl_2$ mit HCl auf pH 7,4

0,025 m KCl

Mikrosomenpuffer: (24)

0,050 m TRIS

0,100 m NaCl

0,001 m EDTA mit HCl auf pH 7,4

1,0 % (w/v) SDS

Dieser Puffer wurde ohne SDS (zum Homogenisieren der Mikrosomenfraktion) und mit SDS hergestellt. Durch Mischung gleicher Teile beider Puffer ergab sich die SDS-Konzentration bei der

Phenolextraktion zu 0,5 % (w/v).

Hydrolysepuffer: (Ribonuklease T_1; pankr. Ribonuklease)(3)

0,250 m TRIS
0,001 m EDTA
mit HCl auf pH 7,5

Phenol:

wurde vor dem Gebrauch im Vakuum destilliert, mit dest. H_2O gesättigt und mit 1 n NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

SSC:

10-fach SSC (1,5 m NaCl; 0,15 m Na-Citrat) als Stammlsg.

K-Acetat:

20 % (w/v) K-Acetatlsg. als Stammlösung

Elektrophoresepuffer:

für die P.A.A.-Rundgelelektrophorese (2)

0,040 m TRIS
0,020 m Na-Acetat
0,001 m EDTA
mit Eisessig auf pH 7,3
0,200 % SDS

für die P.A.A.-Plattengelelektrophorese (25)

0,040 m TRIS-Acetat pH 8,0

für die Hochspannungspapierelektrophorese (1)

5,0 % (v/v) Essigsäure
0,5 % (v/v) Pyridin
pH 3,5

für die Ionophorese mit DEAE-Papier

8,7 % (v/v) Essigsäure
2,5 % (v/v) Ameisensäure
pH 1,9

Puffer für die Ionenaustauschchromatographie: (6)(8)

0,050 m TRIS
7,000 m Harnstoff
mit HCl auf pH 7,5

NaCl-Zusatz zur Gradientenelution: 0,5 % (w/v)
0,05 % (w/v)

Hydrolysepuffer: (PDE aus Kälbermilz)

0,300 m $(NH_4)_2$ Succinat

0,002 m EDTA

Elutionslösungen: (1)

DEAE-Papier

Triäthylamin (30 % (v/v)) wurde mit CO_2 auf pH 6,0 eingestellt und mit einem RNS-Hydrolysat (KOH) auf eine Konzentration von 0,4 mg/ml gebracht.

3 MM Papier

0,400 mg/ml Nukleotide in dest. H_2O

Überführung von DEAE-Sephadex A 25 Cl^- Form in HCO_3^- Form:

DEAE-Sephadex A 25 Cl^- Form wurde so lange abwechselnd mit 2 m NH_4HCO_3 Lsg. und 0,02 m NH_4HCO_3 Lsg. gerührt, bis der Cl^- Nachweis negativ verlief (3-4mal).

Nitrosomorpholinlösungen:

2,4 g N-Nitrosomorpholin wurden zu 100 ml H_2O dest. gelöst und in 20 Proben à 5,0 ml tiefgefroren.

Zur Fütterung wurden diese je 5,0 ml in 2 l Leitungswasser aufgelöst, so daß die Endkonzentration 60 mg/l Trinkwasser betrug.

2.1.3. Geräte

Zentrifugationen:

Beckman Spinco L 50

Spinco L2 50 B

Modell L3-50

Heraeus-Christ Kühlminifuge

UV-Messungen:

Zeiss PMQ II

Beckman DK-2a

Gelscan:
Schoeffel Spectrodensitometer SD 3000 mit Density Computor SDC 300

Gefriertrocknung:
Leybold-Heraeus GT2

Spannungsgeber:
Philips PE 1527 (0-150 V)
CAMAG (0-5000V)

Zellaufschluss:
Homogenisator Potter S (Fa. Braun, Melsungen)

Gelschneider:
"Gel-Slicer" (The Mickle Laboratory Engineering)

Isotopenmessplatz:
Flüssigkeits-Szintillationszähler Nuclear Chicago 720
Flüssigkeits-Szintillationszähler Betaszint BF 5000 mit Diehl algotronic

Tracerlab "Low Background Counter" (LBC) für Trockenproben

Rotoren:
SW 25.2.
R 50 Ti und Zubehör von Beckman Instruments

Folgende Geräte konnten in eigener Werkstatt nach den Angaben von Sanger et al. hergestellt werden:

a) Ionophoresegefäß (50 l Fassungsvermögen) mit Einsatz, Elektrodenleisten und Kühlung (der Einsatz konnte variabel gestaltet werden, so daß der Pufferabstand von 45 cm während der Ionophorese auf 55 cm bei der Hochspannungselektrophorese vergrößert werden konnte)
b) Hochspannungselektrophoreserohr mit einem Pufferabstand von 60 cm bis 70 cm
c) Plattengelelektrophorese mit anodischer und kathodischer Puffermenge von je 2 l
d) div. Gradientenmischgeräte
e) sehr exakte Dreifachpumpe (50-80 ml/h)

Nach eigenen Angaben erteilte mir die Werkstatt eine Entsalzungsbank, mit der gleichzeitig 10 Entsalzungen möglich waren. Die Böulen waren gegen ein Trockenlaufen gesichert.

2.2. Methoden

2.2.1. Markierung mit ^{32}P und N-Nitrosomorpholinfütterung (27)

Jeder Versuch beinhaltete die Aufarbeitung von vier Rattenlebern. Jede Ratte erhielt 24 h und 15 h vor der Tötung je eine intraperitoneale Injektion von 2,5 mCi ^{32} Orthophosphat in 0,5 ml phys. Kochsalzlösung unter Äthernarkose. 24 h vor der Tötung wurde die Nahrung entzogen.

Die unter 2.1.2. aufgeführte N-Nitrosomorpholinlösung bekamen die Tiere ad libitum zu trinken. Das Trinkwasser wurde wenigstens zweimal in der Woche gewechselt, die von den Tieren angenommene Trinkmenge durch Messung des Restvolumens bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration der N-Nitrosomorpholinlösung wurde eine durchschnittliche Trinkmenge von 36 ml pro Tier und Tag bei einem Gewicht von 180 gr zugrunde gelegt. Alle Messungen der Trinkvolumina und der damit verbundenen Nitrosomorpholingaben waren Mittelwerte über max. 10 Tiere.

2.2.2. Isolierung der rRNS (23)

Wenn nicht anders beschrieben, fanden alle Arbeiten bei 4°C statt. Für jeden einzelnen Versuchsansatz mit radioaktiver Markierung wurden die Lebern aus vier Versuchstieren nach Äthernarkose und Ausbluten entnommen, in eiskaltem Homogeni-

sationspuffer grob zerkleinert und 3-4x gewaschen. Die Lebermenge wurde dann gewogen und mit dem vierfachen Volumen des Lebergewichtes an Puffer homogenisiert (Homogenisator Potter S; 1.400 UpM, 7 Hübe). Nach Entfernung des Bindegewebes durch Mullfiltration und Nachspülen mit einem weiteren Volumen Homogenisierungspuffer konnten die Kerne bei 700 g (10 min) sedimentiert werden. Der Überstand (ca. 120-140 ml) wurde einer fraktionierten Ultrazentrifugation unterworfen. Nach Entfernung der "Mitochondrienfraktion" bei 17.000 UpM (R 50 Ti) sedimentierte aus dem gewonnenen Überstand die "Mikrosomenfraktion" bei 110.000 g (3,5 h 42.000 UpM R 50 Ti).
Durch Homogenisieren mit einem Handhomogenisator (Dounce) in ca. 15 ml Ribosomenpuffer (ohne SDS) erhielt man aus den hellroten Pdd. eine Suspension, die durch Hinzufügen des gleichen Volumens Ribosomenpuffer (1 % w/v SDS) sofort klar wurde. Diese Lösung (ca. 30-40 ml) wurde mit dem gleichen Volumen Phenol extrahiert (15 min Schütteln bei Zimmertemperatur). Nach der Phasentrennung durch Zentrifugieren und dem Abheben der wässrigen Phase folgte eine Reextraktion der ersten phenolischen Phase durch ein gleiches Volumen Ribosomenpuffer (0,5 % SDS). Die vereinigten wässrigen Phasen wurden durch zwei weitere Phenolextraktionen und eine Extraktion mit $HCCl_3$/Isoamylalkohol (24:1) bei Zimmertemperatur weiter gereinigt. Ausgefällt wurde die rRNS dann durch Versetzen der wässrigen Phase mit zwei Volumina absolutem Äthanol, nachdem als Fällungshilfe noch K-Acetat bis zur Endkonzentration von 2 % hinzugegeben wurde. Nach

Stehen über Nacht bei -18°C erhielt man die rRNS durch Zentrifugieren als Sediment. Nach nochmaligem Waschen mit 80 Vol% Äthanol, Trocknung und Auflösen in 2,5-3 ml 1x SSC, konnte die Ausbeute (Ext. $\frac{260\ nm}{1\ cm}$ 0,005 = 1 γ/ml), die Radioaktivität (in 10 ml SSC) und die Intaktheit der rRNS (2,4 P.A.A.-Rundgelelektrophorese) bestimmt werden.
Zur weiteren Verarbeitung wurde nur rRNS benutzt, deren Extinktionsverhältnis $\frac{260\ nm}{280\ nm} > 2{,}0$ war.

2.2.3. Isolierung der rRNS-Arten (8)

Die Isolierung der rRNS-Arten erfolgte durch einen vorgeformten, neutralen Rohrzuckergradienten im SW 25.2 Rotor bei 25.000 UpM für 20 h. Für die Gleichheit der Gradienten in den drei Ausschwingbechern sorgte eine sehr exakte Dreifachpumpe, die aus einem Mischgefäß die drei Gradienten von je ca. 63 ml in 2,5 - 3 h füllte. Die Gradienten verliefen von 40 % Rohrzucker in 1x SSC zu 10 % Rohrzucker in 1x SSC. Dazu wurden von beiden Lösungen je 95 Gramm in die Kammern des Mischgefäßes gegeben, nach Abfließen von ca. je 2 ml 40%iger Sucroselösung in die Nitrocelluloseröhrchen (zur Bildung eines dichten Sucrosekissens) die beiden Kammern verbunden und der Rührkern in Gang gesetzt.
Die Überschichtung der Gradienten mit der rRNS-Lösung erfolgte in 0,8 - 1,0 ml (4-7 mg rRNS). Eine Sicherung vor Austrocknung und mechanischen Störungen stellte das Überschichten mit Paraffinöl dar. Nach dem Zentrifugieren wurden die mit Tesaband zweifach unterklebten Nitrocellulosetubes in einem Ablaufgerät auf eine fest eingespannte

Kanüle aufgespießt, und der Inhalt im Fraktionssammler in je 40-46 Fraktionen à 20 Tropfen aufgeteilt.
Je 5 µl jeder Fraktion - in Filterpapier aufgesogen - konnten dann im L.B.C. auf die Radioaktivität hin gemessen werden. Aus den gewonnenen Verteilungsbildern (Abb. 1) konnten

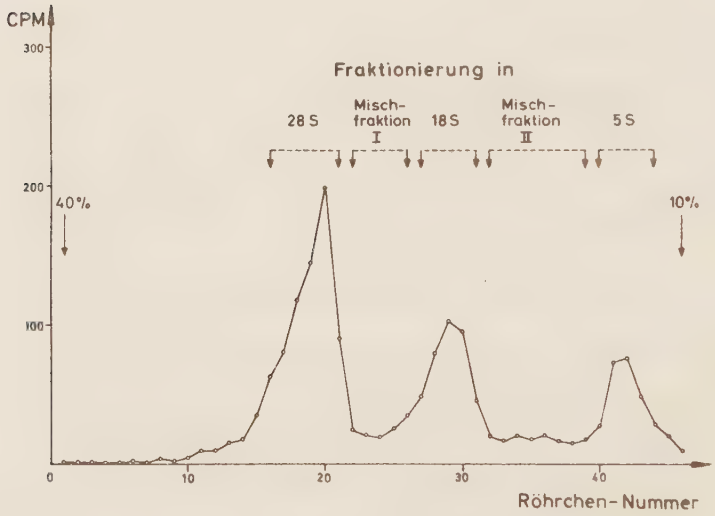


Abb. 1: Sucrosegradientenzentrifugation der rRNS: Bed.: s. Text. Die Auszählung der Fraktionen erfolgte durch Entnahme von 5 µl pro Fraktion und Zählung der Radioaktivität in 10 ml H_2O (L.S.C.) oder Auftrocknung auf Filterpapier (L.B.C.).

fünf Bereiche isoliert und gefällt werden: von 28 S, 18 S und 4/5 S rRNS die Spitzenfraktionen, sowie die Zwischenbereiche "Mischfraktionen I" (Bereich zwischen 28 S und 18 S rRNS) und "Mischfraktionen II" (Bereich zwischen 18 S und 4/5 S rRNS. Die vereinigten Fraktionsvolumina wurden wieder mit K-Acetat und Äthanol gefällt (s.o.).
Die Auflösung der gefällten rRNS-Arten erfolgte in Hydrolysepuffer. Die fünf isolierten RNS-Bereiche unterlagen wieder der Prüfung auf Reinheit und Intaktheit durch P.A.A.-Gelelektrophorese.
Für die weitere Bearbeitung und Analytik - ausgenommen die Bruttobasenzusammensetzung und die Bestimmung der alkalistabilen Nukleotide - wurden lediglich die 28 S rRNS und 18 S rRNS benutzt. Es wurden drei Abbauwege beschritten, von denen zwei enzymatischer Natur waren, der dritte eine alkalische Hydrolyse darstellte.

2.2.4. Enzymatische Abbauten

Für den enzymatischen Abbau mit Ribonuklease T_1 wurde ein Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:5000, für die enzymatische Hydrolyse mit Ribonuklease aus Pankreas ein Verhältnis Enzym/Substrat von 1:100 gewählt. Beide Hydrolysen dauerten 18 h bei 37°C. Der Abbaustopp bestand in einer Ansäuerung (0,1 n HCl), die - zur Öffnung vorhandener zyklischer Nukleotide - für weitere 18 h bei 4°C beibehalten wurde. Nach

dem Neutralisieren mit NaOH, Zugabe von Harnstoff und Verdünnung auf das 10fache Volumen mit Harnstoffpuffer (0,05 m TRiS·HCl pH 7,5; 7 m Harnstoff) konnten die Hydrolysate direkt auf die DEAE-Sephadexsäulen aufgebracht werden. Die Berechnung der RNS-Konzentration ergab sich aus Ext. 260 $\overset{1cm}{nm}$ 0,025 ≙ 1 γ/ml RNS.

Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Enzymzugaben war durch eine einstellbare Gilson-Pipette gewährleistet. Da jedoch ein möglicher Pipettierfehler bei < 5 µl zu schwerwiegend geworden wäre, wurde die Verdünnung der Enzymlösung so gewählt, daß wenigstens 10 µl pipettiert werden konnten. Alle Enzymzugaben der pankr. Ribonuklease stammten aus einer Stammlösung mit 25 mg/ml Hydrolysepuffer.

2.2.5. Alkalische Hydrolysen: (9)(26)

Hier wurden zwei Hydrolysen mit KOH vorgenommen:

0,3 m KOH	18 h	37°C
1,0 m KOH	1 h	80°C

Nach dem Neutralisieren mit $HClO_4$, Abzentrifugieren des $KClO_4$ und Einengen des Hydrolysates konnte die quantitative Bestimmung der Nukleotide mittels Papierelektrophorese [illegible].

2.2.6. DEAE-Sephadexsäulen: (6)

DEAE Sephadex A25 wurde nach Quellung in 7 m Harnstoff-

puffer (0,05 m TRIS·HCl pH 7,5) von feinen Partikeln durch Dekantieren abgetrennt und in gekühlte Glassäulen eingefüllt. Nach 24-stündigem Absetzen und nachfolgender Spülung mit obigem Harnstoffpuffer über Nacht erfolgte der Auftrag der enzymatischen bzw. alkalischen Hydrolysate sowie eine Nachspülung mit 6 bis 8-fachem Säulenvolumen. Der Elutionssalzgradient ging von 0,05 m NaCl bis 0,5 m NaCl in Harnstoffpuffer. Zur Fraktionierung des Ribonuklease F_1 Abbaus hatten die Säulen eine Länge von 25 cm und einen Durchmesser von 0,6 cm, das Gradientenvolumen betrug insgesamt 600 ml, das Fraktionsvolumen je 4,2 ml und die Elutionsgeschwindigkeit 4 min/ml.

Für die Ionenaustauschchromatographie des Hydrolysates der Ribonuklease aus Pankreas wurden andere Säulen benutzt: 25 cm lang, 0,4 cm Ø, Gradientenvolumen 500 ml, Fraktionsvolumen je 3,0 ml, Tropfgeschwindigkeit 7 min/ml. Auftrennungen der alkalischen Hydrolysate erforderten Säulen mit 15 cm Länge und 0,6 cm Ø (Gradientenvolumen 300 ml; Fraktionsvolumen je 3,0 ml; Tropfgeschwindigkeit 2 min/ml) (Abb. 2 - 4).

2.2.7. Entsalzung und Isolierung der Nukleotide: (6)

Zur Entsalzung der durch die Ionenaustauschchromatographie voneinander getrennten Nukleotide ist eine starke Verdünnung der gesammelten Säulenfraktionen notwendig, um eine Voll-

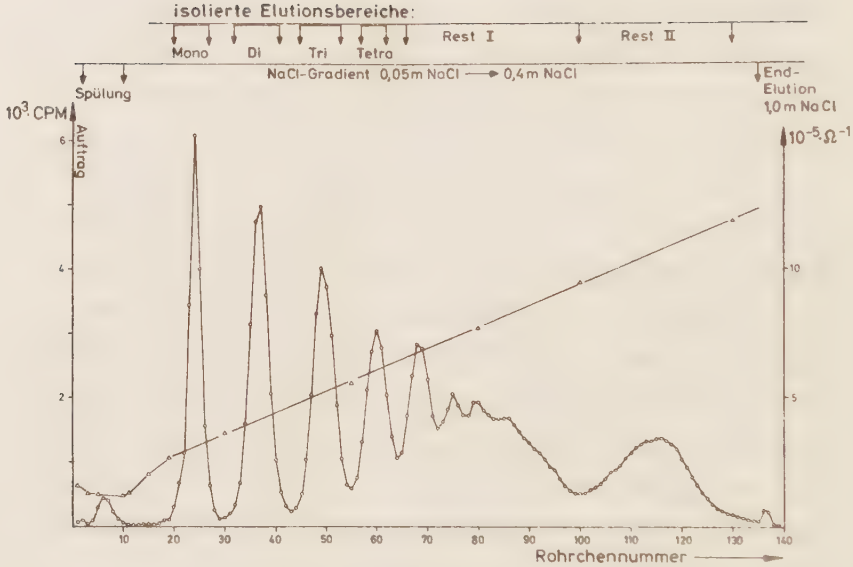


Abb. 2: Auftrennung eines T_1-RNase-Hydrolysates auf einer [illegible]-Sephadexsäule (A 25):
Die Fraktionierung unterteilte sich in Materialauftrag (Röhrchen 1-2), Spülung mit Harnstoffpuffer (Röhrchen 3-10), Gradientenelution mit NaCl (Röhrchen 11-134) und Endelution mit 1 m NaCl in Harnstoffpuffer (134-140). Die Röhrcheninhalte wurden mit H_2O auf 10 ml verdünnt und im L.S.C. gemessen. Anschließend wurden die Fraktionsvolumina der verschiedenen Nukleotidbereiche zusammengegeben und entsalzt. Die Benennung der eluierten Nukleotide erfolgte durch Voranstellung des Ausgangsmaterials und Hintanstellung des angewendeten Enzyms, also z.B. hießen die Dinukleotide des T_1-RNAse-Abbaus von 28 S rRNS 28 Di T_1.
Da die Auftrennung hinter den Tetranukleotiden zu ungenau wurde, mußten die mit Rest I und Rest II bezeichneten Säulenelutionsbereiche über die Flächengelelektrophorese weiter aufgetrennt und dafür vorher entsalzt werden.

Benennungen:

Mono	: Mononukleotide (hier: Gp)
Di	: Dinukleotide (hier: CpGp; ApGp; UpGp)
Tri	: Trinukleotide auf -Gp endend
Tetra	: Tetranukleotide auf -Gp endend
Rest I	: Penta- bis Decanukleotide
Rest II	: höhere Oligonukleotide

Die Leitfähigkeiten wurden nach der Verdünnung der Fraktionsvolumina auf 10 ml (mit H_2O dest.) gemessen.

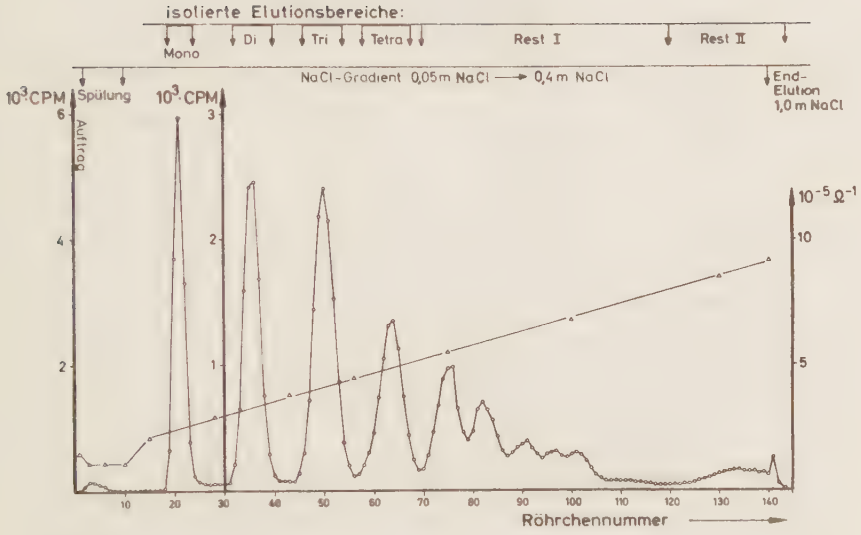


Abb. 3: Auftrennung eines p-RNAse-Hydrolysates auf einer DEAE-Sephadexsäule (A25):
Materialaufgabe, Spülung und Elution der Säule, Radioaktivitätsmessung der Röhrcheninhalte und Isolierung der eluierten Nukleotidbereiche erfolgten analog der Fraktionierung des T_1-RNAse Abbaus.
Entsalzt und weiter aufgetrennt wurden lediglich die ersten vier Elutionsbereiche. Die höheren Oligonukleotide wurden wieder wie in Abb. 2 zusammengefaßt (Rest I; Rest II) und dienten zur prozentualen Berechnung der eluierten Radioaktivität.

Benennungen:

Mono : Mononukleotide (hier Up; Cp)

Di : Dinukleotide (hier ApCp; GpCp; ApUp; GpUp)

Tri : Trinukleotide auf -Up oder -Cp endend

Tetra : Tetranukleotide auf -Up oder -Cp endend

Die Leitfähigkeiten wurden nach der Verdünnung der Fraktionsvolumina auf 10 ml (mit H_2O dest.) gemessen.

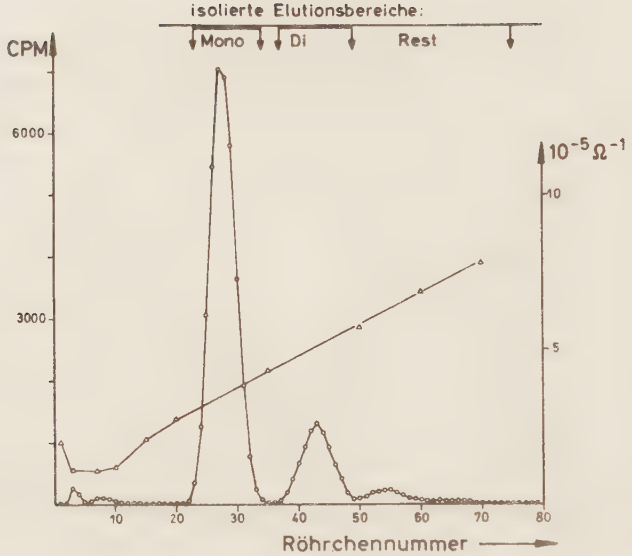


Abb. 4: Auftrennung eines alk. Hydrolysates von [illegible] DEAE-Sephadexsäule:
[illegible] Aufgabe, Spülung und Elution der Säule, [illegible] Radioaktivität und Isolierung der eluierten [illegible] Elution erfolgen analog der Fraktionierung der [illegible].

Mono- und Dinukleotide wurden entsalzt und weiter aufgetrennt.

[illegible]:

Mono: Mononukleotide (hier Ap; Cp; Gp; Up)

Di : Dinukleotide (alkalistabil)

[illegible]: Trinukleotide und höhere Oligonukleotide (alkalistabil)

Die Leitfähigkeiten wurden nach der Verdünnung der Fraktionsvolumina auf 10 ml (mit H_2O dest.) gemessen.

[illegible] die Adsorption an das Sephadex A-25-Gel (HCO_3^--Form) zu erreichen. Die Verdünnung mit H_2O dest betrug 1:8 bis 1:10. Die verdünnten Nukleotidfraktionen wurden dann unter

Kontrolle der Tropfgeschwindigkeit auf 3-4 ml umgewandeltes Sephadexgel gegeben, das mit 0,02 m NH_4HCO_3 Lsg. equilibriert war. Die Mononukleotide wurden zuerst mit 2 x 50 ml H_2O, dann mit 3 x 50 ml 0,02 m NH_4HCO_3 Lösung gewaschen. Alle anderen adsorbierten Nukleotide mit 2 x 100 ml 0,02 m NH_4HCO_3Lösung. Die Elution vom Gel erfolgte mit 3 x 10 ml 2,0 m NH_4HCO_3 Lösung.

Der gesamte Entsalzungsvorgang unterlag einer Kontrolle durch Messung der Radioaktivität von Auftrags-, Durchlauf-, Wasch- und Elutionslösung. Da mehr als 90 % der Aktivitäten in den ersten 20 ml Elutionslösung vorhanden war, wurden nur diese - nach Verdünnung mit H_2O - auf 100 ml - gefriergetrocknet. Zwei weitere Gefriertrocknungen mit 12 ml und mit 2,5 ml schlossen sich an. Um letzte Reste von NH_4HCO_3 zu entfernen, erfolgten nach den drei Gefriertrocknungen noch drei Vakuumtrocknungen mit 0,300 ml, 0,200 ml und 0,1 ml H_2O. Die zurückgebliebenen nichtflüchtigen Karbonate gingen durch 1:3 verdünnten Elektrophoresepuffer (pH 1,9) in Lösung. Nach einer weiteren Vakuumeintrocknung konnten die in 10-30 µl H_2O aufgenommenen Nukleotide dann auf die zwei Elektrophoresepapierarten und das Plattengel aufgebracht werden.

2.2.8. Hochspannungspapierelektrophorese: (1)

Für die Mono- und Dinukleotide (sowohl aus dem T_1-Abbau als auch aus dem pankr. RNAse-Abbau) ergab sich die Möglichkeit der elektrophoretischen Auftrennung auf normalem

Papier (3 MM) im Pyridin/Essigsäurepuffer pH 3,5.
Zur Auftrennung der Mononukleotide (aus alkalischen und enzymatischen Hydrolysen) genügte eine Auftrennung über 50 cm. Bis zu zehn Proben konnten in einem Lauf analysiert werden im Ionophoresegefäß (60 Volt/cm).
Zwei Farbstoffe liefen bei allen diesen Elektrophoresen als Referenz mit: "Xylene Cyanol F.F." und Säurefuchsin (rot), das das Ende der Elektrophorese anzeigte, wenn es den Anodenpuffer erreicht hatte. X.C.F.F. (blau) diente als Bezugspunkt in den Auswertungskurven.
Um die Dinukleotide zu trennen, war eine längere Elektrophorese notwendig, die im Hochspannungselektrophoreserohr ausgeführt wurde. Die Papierlänge konnte hier auf 65 cm erweitert werden (60 V/cm). Der 80 cm lange Papierstreifen wurde so in das Rohr gehängt, daß sich ca. 15 cm davon im Anodenpuffer befanden. Nach Wanderung des Säurefuchsins bis zum Anodenpuffer wurde die Elektrophorese unterbrochen, die ersten 15 cm des Papierstreifens wurden abgeschnitten und der Streifen zur weiteren Elektrophorese wieder eingehängt. Durch diese "moving up" Technik war die Auftrennung der Dinukleotide vollkommen (Abb. 5-7).

2.2.9. Ionophorese mit DEAE Papier: (1)
Die Tri- und Tetranukleotide konnten durch Ionenaustauschelektrophorese auf DEAE Papier mit einem Ameisensäure/Essigsäurepuffer (pH 1,9) im Ionophoresegefäß aufgetrennt werden.

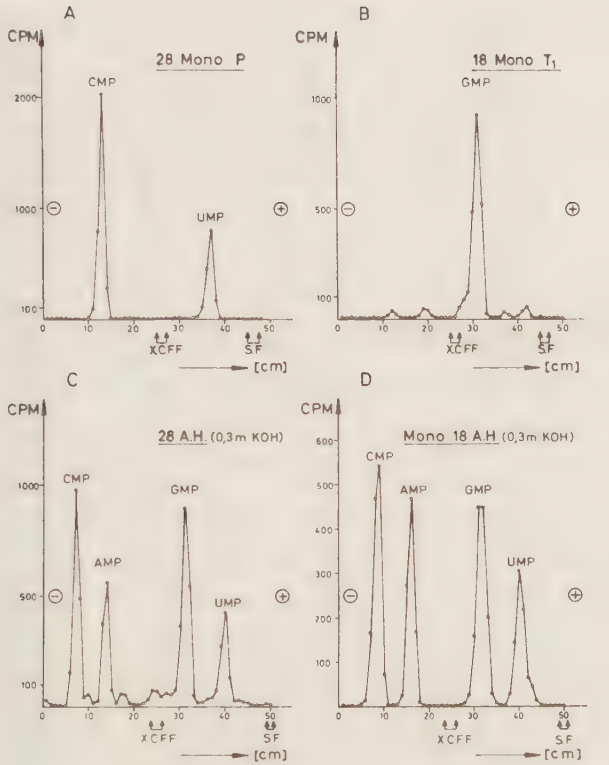


Abb. 5: Hochspannungspapierelektrophorese von Mononukleotiden: Bed. . s. Text, X.C.F.F. = "Xylene Cyanol F.F.", S.F. = Säurefuchsin
Die Papierstreifen wurden in 1 cm breite Stücke geschnitten und im L.B.C. (Leerwert 1,0 Count/min.) gezählt.

A.: Auftrennung der entsalzten Mononukleotide eines Hydrolysates von 28S rRNS (pankr. RNAse): 28 Mono P. (Abb. 3).
B.: Auftrennung der entsalzten Mononukleotide eines T_1-RNAse-Abbaus von 18S rRNS: 18 Mono T_1 (Abb. 2).
C.: Auftrennung eines alkalischen Hydrolysates von 28S rRNS (0,3 m KOH; 18 h; 37°C).
D.: Auftrennung eines alk. Hydrolysates von 18S rRNS nach Abtrennung der Oligonukleotide über eine DEAE-Sephadexsäule: Mono 18 A.H. (Abb. 4).

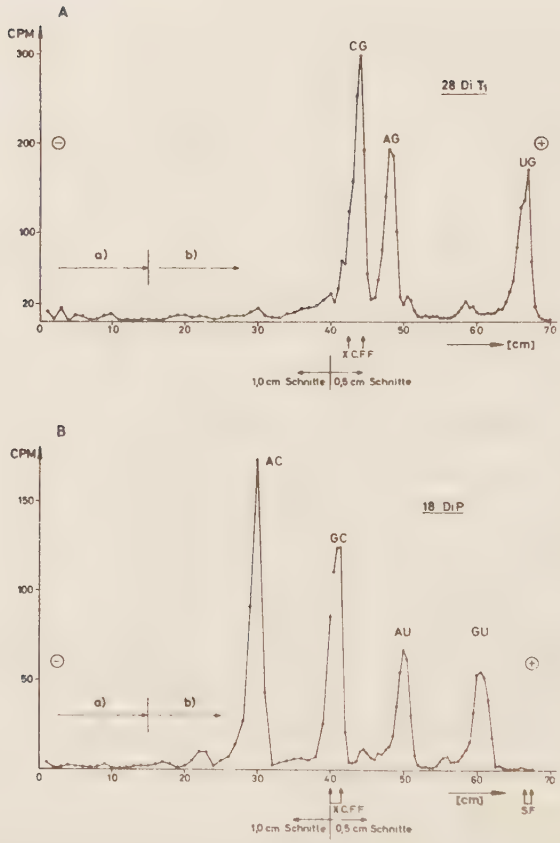


Abb. 6: Hochspannungspapierelektrophoresen der durch p-RNAse und T_1-RNAse Abbau gewonnenen Dinukleotide: Bedingungen und "moving up" Technik siehe Text. Die Pfeile a) und b) bezeichnen die Papierbereiche, die - durch die "moving up" Technik bedingt - unterschiedlicher Elektrophoresedauer unterworfen waren: a) = ca. 2 h, b) = 3 h. Der über 75 cm lange Papierstreifen wurde aus technischen Gründen verschieden geschnitten: die ersten 40 cm in Fraktionen à 1 cm, der übrige Bereich in Fraktionen à 0,5 cm. A.: Fraktionierung von entsalzten Dinukleotiden eines T_1-RNAse-Hydrolysates von 28 S rRNS. B.: Fraktionierung von entsalzten Dinukleotiden eines p-RNAse-Abbaus von 18 S rRNS.

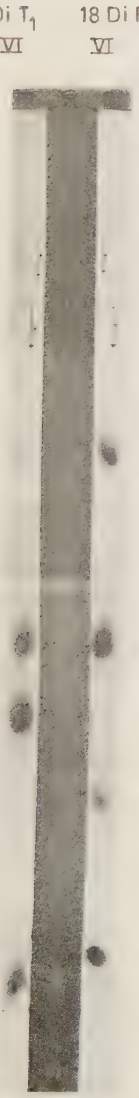


Abb. 7: Autoradiogramm einer Hochspannungspapierelektrophorese von Dinukleotiden eines T_1-RNAse Abbaus (18 Di T_1) und eines Hydrolysates mit p-RNAse (18 Di P).
Bedingungen s. Text; a) und b) s. Abb. 6
A.L. = Auftragslinie.
Wegen der Länge mußten die Papierstreifen für das Autoradiogramm geteilt werden. Das Foto fügt die Teile hier wieder zusammen.

Hierzu wurde das DEAE Papier auf dem Einsatzständer des Gefäßes mit einem Sprühapparat befeuchtet und anschließend bei 30 V/cm der Elektrophorese unterworfen. In diesem System wanderte nur das X.C.F.F. als Indikator mit. Zur optimalen Auftrennung der Substanzen mußte der blaue Farbstoff bei den Trinukleotiden 20-22 cm, bei den Tetranukleotiden aus pankr. RNAse-Abbau 30-32 cm und bei den Tetranukleotiden aus der T_1-RNAse-Hydrolyse 36-37 cm gewandert sein. Anschließend wurden die Papiere in einer Trockenpresse geglättet (Abb. 8 - 9).

2.2.10. Plattengelelektrophorese:

Die Herstellung der Plattengele von 400 x 2 x 150 mm erfolgte nach (25). Es wurde mit einer 20%igen Acrylamidkonzentration und mit TRIS Ac.-Puffer pH 8,0 gearbeitet. Die Substanzen (R I und R II von 18S rRNS und 28S rRNS und 28S rRNS) in 20 ul H_2O wurden mit 40 ul einer Lösung von Sucrose (50 %)

Abb. 8: Autoradiogramm einer Ionophorese auf DEAE Papier von Trinukleotiden aus
a) dem T_1-Abbau von 18S und 28S rRNS des Versuches Ic und
b) dem p-RNAse-Abbau von 18S rRNS des Versuches VI und 28S rRNS des Versuches IV.

Bed. s. Text; Bezeichnungen s. Ergebnisteil; A.L. = Auftragslinie

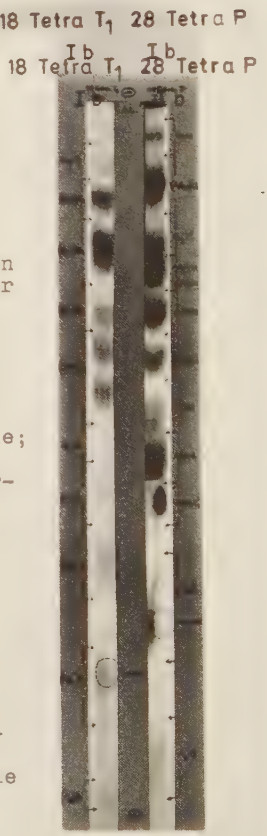


Abb. 9:
Autoradiogramm einer Ionophorese von Tetranukleotiden aus dem T_1-Abbau der 18S rRNS (18 Tetra T_1) und dem Abbau mit p-RNAse der 28S rRNS (28 Tetra P) des Versuches Ib auf DEAE-Papier. A.L. = Auftragslinie; Bed. s. Text; Bezeichnungen s. Ergebnisteil

und den Farbstoffen X.C.F.F. (0,2 %), Eosin (1,0 % und Trypanrot (0,5 %) in dreifach konzentriertem Elektrophoresepuffer versetzt und in die vorgeformten Nuten gegeben. Anschließend wurde

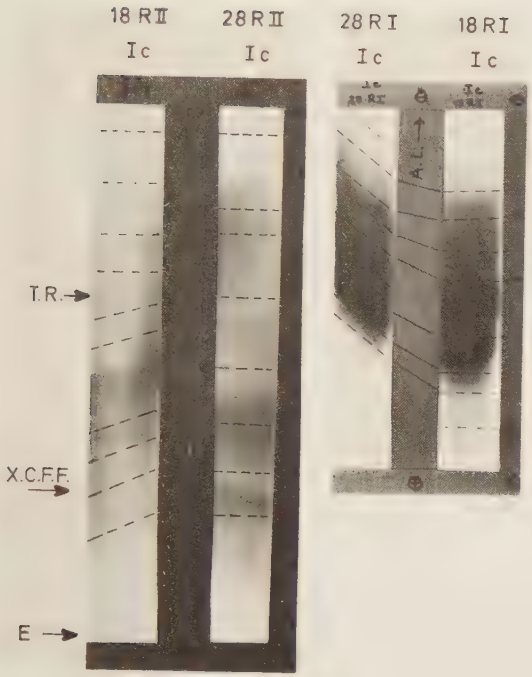


Abb. 10: Autoradiogramm einer P.A.A.-Plattengelelektrophorese; Bezeichnungen s. Abb. 2; Bedingungen s. Text.
T.R. = Trypanrot; E = Eosin; A.L. = Auftragslinie; bei 18 und 28 RI ist nur der untere Teil der Gelplatte abgebildet, bei 18 und 28 RII nur der obere Teil.

das Gel von den Glasplatten befreit, auf eine feste Folie gelegt, mit einer dünnen Folie belegt und bei -18°C autoradiographiert (Abb. 10).

2.2.11. Rundgelelektrophorese

Die Prüfung der rRNS auf Intaktheit nach der Phenolreinigung und der Reinheit von 18S und 28S RNS nach der Rohrzuckergradientenzentrifugation konnte auf P.A.A.-Rundgelelektrophorese erfolgen. Die Herstellung der 2,4 %igen Polyacrylamidgele in Plastikröhrchen (10 cm lang; Ø 0,6 cm) sowie der Puffer erfolgte analog (24). Allerdings entfiel die Quellung der Gele, so daß sofort nach der Vorelektrophorese das mit Sucrose beschwerte Material unterschichtet wurde. Die Bedingungen der Elektrophorese waren: 10 V/cm Gel; 90 min; 4°C. Anschließend wurden die Gele bei 260 nm gemessen.

Die Bedingungen des Densitometers waren: Spalt 0,5 mm, λ = 260 nm, Bandbreite 1 nm, Tischvorschub 25 mm/min, Papiervorschub 50 mm/min. Die Messung erfolgte im Zweistrahlverfahren mit Leergel. Die durchgemessenen Gele konnten dann eingefroren und in 1 mm dicke Scheiben geschnitten werden, deren Aktivität bestimmt wurde (Abb. 11 - 12).

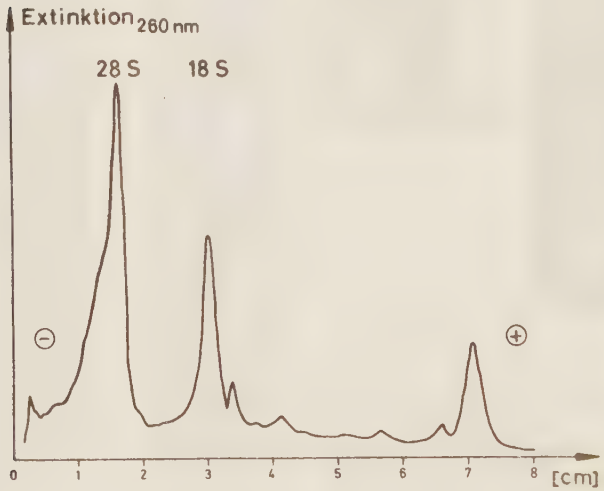


Abb. 11: Densitometrische Auswertung einer P.A.A.-Rundgelelektrophorese von nicht fraktionierten rRNS. Bed.: s. Text.

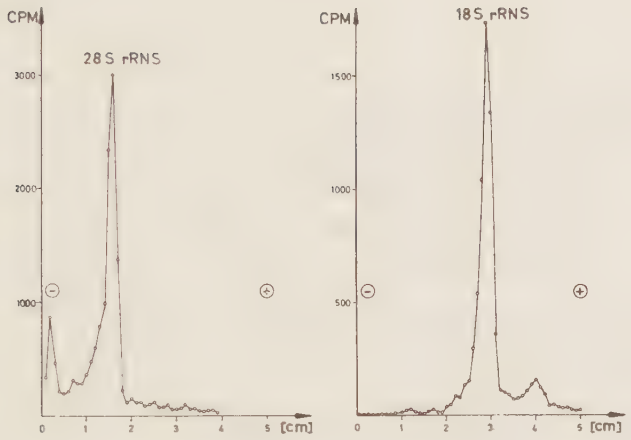


Abb. 12: Verfolgung der Reinigung von 18 S und 28 S rRNS durch P.A.A.-Rundgelelektrophorese:
Bed.: 100 V, 90 min.
Das Gel wurde in einem Aluminiumtrog mit CO_2 fest eingefroren und in Scheiben von 1 mm Dicke zerlegt, die nach Auftrocknung auf Filterpapier im L.B.C. gezählt wurden.

2.2.12. Autoradiogramme: (1)

Die Elektrophoresestreifen (bzw. die Plattengele) wurden zusammen mit Röntgenfilmen in mit Bleiplatten und Röntgenfilmverstärkerfolien versehene Kassetten gebracht und lichtdicht abgeklebt. Je nach aufgegebener Aktivität und Anzahl der zu erwartenden "Spots" betrug die Zeit der Exponierung zwischen 3 Tagen und einem Monat. Die nach dem Röntgenfilm identifizierten Papierbereiche wurden

im L.S.C. quantifiziert.

2.2.13. Analyse der Nukleotide

2.2.13.1. Elution aus 3 MM Papier: (1)

Die über die Autoradiogramme bzw. die direkte Auszählung erkannten und vereinigten Papierbereiche wurden mit der unter 2.1.2. angegebenen Lösung 3x equilibriert und abzentrifugiert. Die wässrigen Lösungen (ca. 5-10 ml) wurden durch Gefriertrocknung und Trocknung i.V. auf 20-40 µl eingeengt.

2.2.13.2. Elution aus DEAE Papier: (1)

Hier mußte mit der unter 2.1.2. aufgeführten Triäthylammoniumcarbonatlsg. gearbeitet werden. Die Elution ergab 3-5 ml für einen "Spot". Durch mehrmaliges Trocknen an der Luft und Aufnehmen mit H_2O konnten die Salze entfernt und die Nukleotide eingeengt werden.

2.2.13.3. Alkalische Hydrolysen: (26)

Die eluierten Nukleotide wurden einer KOH-Behandlung (1,0 m KOH, 80°C, 1 h) unterworfen, mit $HClO_4$ neutralisiert und der Überstand nach dem Zentrifugieren direkt elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 13).

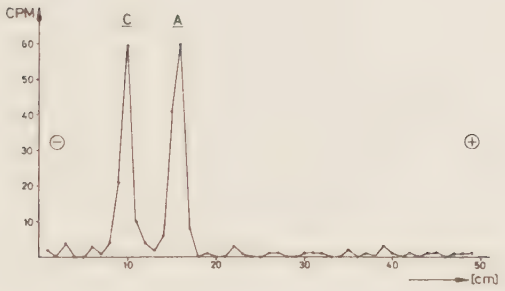


Abb. 13: Hochspannungspapierelektrophorese eines alkalischen Hydrolysates vom Dinukleotid ApCp (Abb 6 B), das aus den entsprechenden Fraktionen der Dinukleotidauftrennung eluiert worden war.

2.2.13.4. Phosphodiesteraseabbau

Der Abbau von eluierten Nukleotiden mit PDE (aus Kälbermilz in 20-40 µl des unter 2.1.2. aufgeführten Puffers, dem 0,4 mg/ml Enzym zugesetzt war. Nach 26 h bei 37°C erfolgte eine zweimalige Vakuumtrocknung mit nachfolgender Elektrophorese der entstandenen Mononukleotide.

2.2.14. Methoden der Auswertung

2.2.14.1. DEAE Sephadexsäulen:

Durch Summation der Aktivitäten der Fraktionen eines "Elutionspeaks" unter Bezugnahme der eluierten Gesamt-

aktivität ergaben sich die Prozentzahlen der Nukleotid-bereiche einer Säule.

2.2.14.2. Elektrophoresepapiere

Die "Spots" der Elektrophoresepapiere wurden durch die Summation der Aktivitäten der geschnittenen Fraktionen - bezogen auf die Gesamtaktivität der "Spots" - berechnet. Wenn die "Spots" durch Autoradiogramme voridentifiziert worden waren, konnten die radioaktiven Bereiche ausgeschnitten und direkt gezählt werden. Zwischen beiden Auswertungsmethoden ergaben sich keine Unterschiede bei der Berechnung.
Für alle Trockenpräparate stand der L.B.C. zur Verfügung, so daß - bei einem Leerwert von 1 CPM - noch geringste Aktivitäten meßbar blieben.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der N-Nitrosomorpholinfütterung und Darstellung der durchgeführten Versuche

Abbildung 14 zeigt die graphische Darstellung der zeitabhängigen Nitrosomorpholinfütterung. Die Werte wurden durch

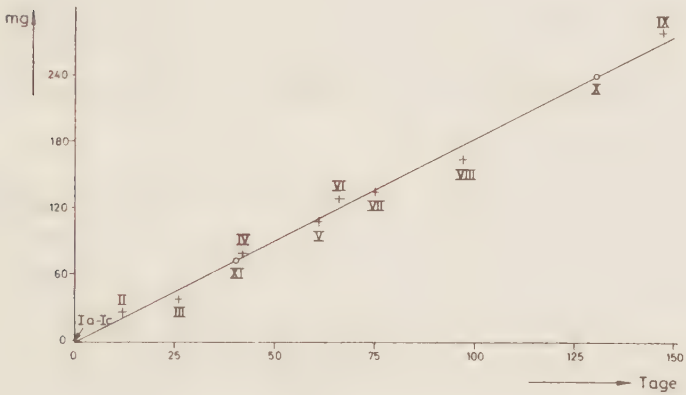


Abb. 14: Zeitabhängigkeit der N-Nitrosomorpholinfütterung
Aufgetragen wurde die pro Ratte insgesamt gegebene Menge NNM (in mg) gegen die Fütterungsdauer (in Tagen).
Jeder Punkt der Ausgleichsgeraden entspricht einem Versuch; der mittlere Fehler der Einzelmessung beträgt ±8,2 mg, die Steigung 1,9 mg/Tag. Versuch X und Versuch XI wurden zur Ausgleichsrechnung nicht mit herangezogen, da diese Versuche außerhalb der Versuchsreihe standen (s.u.).

die Rückmessung der Trinkrestvolumina erhalten. Jeder Punkt entspricht einem durchgeführten Versuch. Drei Versuche ohne NNM (Kontrollversuche) wurden im Abstand von 6 Monaten durchgeführt, um Fehler durch Enzymalterung, Pufferabweichungen u.ä. erkennen zu können. Eine Statistik der aufgeführten Versuchspunkte war aus Gründen des Versuchsaufbaus nicht möglich. Fehlende Werte in den Einzelergebnissen der Tabellen entsprechen Laborunfällen. Wegen häufig geringer Materialmengen war eine Wiederholung von Einzelbestimmungen dann nicht möglich.

Wie Abb. 14 zeigt, ist der mittlere Fehler der Einzelmessung für einen biologischen Versuch mit $\pm$ 8,2 mg gering. Die Steigung der Kurve mit 1,9 mg NNM pro Tag entspricht bei der unter 2.2.1. angegebenen Dosierung einem Trinkvolumen von 31,7 ml/Tag und damit einer umgerechneten Dosierung von 10 mg NNM/kg.

Die Versuchspunkte werden im folgenden mit den in der Abb. 14 verwendeten römischen Ziffern bezeichnet (Kontrollversuche: Ia Ib Ic = I (Mittelwert)). Versuche, in denen NNM gegeben wurde, erhielten die Ziffern II-IX.
Ferner findet im Ergebnisteil ein Versuch Platz, in dem nach NNM-Fütterung für 131 Tage dieses wieder für 48 Tage vor der Aufarbeitung durch Wasser ersetzt wurde (X).
Ein weiterer Versuch, bei dem 20 Rattenlebern aufgearbeitet wurden und keine Markierung mit ^{32}P stattfand, diente zur

Isolierung bestimmter Nukleotide (s.u.). Dieser Versuchsansatz dauerte 40 Tage; die Tiere erhielten insgesamt eine Dosis von 720 mg/Tier (XI).

3.2. Ergebnisse der Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugationen

In Abhängigkeit von der NNM-Fütterung ergaben sich im Bild der Rohrzuckerdichtegradienten einige Verschiebungen, die durch die Abb. 15 deutlich gemacht werden. Eine Radio-

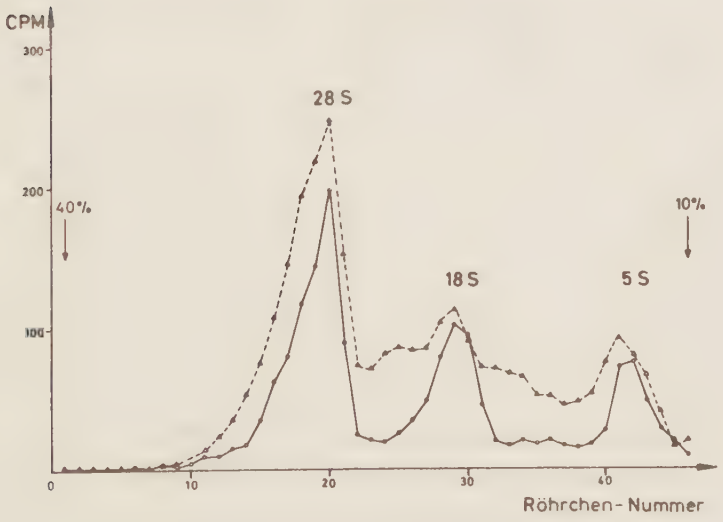


Abb. 15: Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugation
----- Versuch Ib ——— Versuch VIII
Bed. und Bezeichnungen s. Abb. 1

aktivitätserhöhung im Bereich "Mischfraktionen II" spiegelt eine gesteigerte Neusynthese zellulärer Bausteine wieder, was sich im Vergleich der spezifischen Aktivitäten (s.u.) belegen läßt.
Eine andere Erscheinung ist die Verbreiterung und Schulterbildung des 18S rRNS-Bereiches, die zur Folge hat, daß mit zunehmender Fütterungszeit des Karzinogens die Isolierung der 18S rRNS schwieriger und verlustreicher wurde.

3.3. Verlauf der Ausbeuten der rRNS und der spezifischen Aktivitäten der 18S und 28S rRNS

Die Werte für die spezifischen Aktivitäten in Tabelle 1 der isolierten Bereiche aus Abb. 1 zeigen einen Wellenverlauf. Nach anfänglicher Steigerung des Einbaus der angebotenen Radioaktivität erfolgt ein Abfall, der die Einbaurate der Kontrollversuche jedoch nicht wieder erreicht. Werden die Tiere weiterhin mit dem Karzinogen gefüttert, erfolgt ein weiterer Anstieg der Anbaurate von ^{32}P, der die erste Einbaurate noch wesentlich übersteigt.
Dieser Verlauf ist allgemein für die ribosomalen Ribonukleinsäuren und den Bereich "Mischfraktionen II". Der Bereich MI (Abb. 1) jedoch zeigt nach anfänglicher Steigerung der spez. Aktivität keine weiteren Veränderungen, die spez. Aktivität bleibt konstant.

	Ia	Ib	Ic	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
eberge- icht(gr)	26,8	25,4	27,0	30,0	30,6	30,0	24,0	27,0	26,0	28,2	25,6	29,
g ▼ RNS	17,2	18,4	13,4	19,0	15,7	15,4	16,7	16,0	16,8	17,1	19,5	16,
pez.Akt. RNS	137,5	116,7	136,5	198	219,9	203,8	199,8	188	175,0	290,0	221,9	175,
pez.Akt. 8S rRNS	119,0	111,3	117,8	176,9	211,6	172,1	183,0	190,2	179,4	242,5	205,7	125,
pez.Akt. 8S rRNS	100,0	96,6	114,5	155,1	198,2	176,5	158,0	179,0	157,4	161,0	161,2	110,
pez.Akt. S rRNS	181,0	162,5	167,8	276,5	278,4	247,9	220,4	268,4	260,6	328,0	277,3	196,
pez.Akt. I	83,4	85,5	81,8	127,8	144,4	142,8	150,0	137,8	144,5	-	151,6	101,
pez.Akt. II	149,5	118,5	151,1	224,2	248,3	202,5	172,0	231,3	203,9	291,0	231,1	-

Tabelle 1: Spezifische Aktivitäten und Ausbeuten der rRNS der in Abb. 14 beschriebenen Versuchspunkte. Zur Benennung s. Abb. 1; die spezifischen Aktivitäten der rRNS wurden jeweils zwei Tage, die anderen spez. Aktivitäten jeweils vier Tage nach der Injektion von ^{32}Phosphat gemessen. Der hier aufgenommene Versuch X (s. 3.11) wurde in den übrigen Tabellen des Ergebnisteils nicht berücksichtigt, sondern getrennt dargestellt.

Spez. Aktivität: $\left[\frac{\text{counts}}{\text{min. x } \mu g}\right]$

Der Verlauf bei MI kann als "normal" bezeichnet werden, da die Einbaurate von ^{32}P durch die Regeneration der Leber nach Schädigung durch das Karzinogen zunehmen muß.
Anders zu deuten ist der Verlauf der Einbauraten der übrigen isolierten Bereiche. Der verminderte Einbau von ^{32}P als Ausdruck verringerter rRNS Biosynthese bei fortgesetzter Fütterung des Karzinogens könnte auf eine zeitlich begrenzte verminderte Regenerationsfähigkeit hinweisen.
Weiterhin zeigt Tabelle 1, daß die 28S rRNS leicht höher markiert ist als die 18S rRNS. MI (also der Bereich zwischen 28S und 18S rRNS im Sucrosedichtegradienten) besitzt jedoch immer eine geringere spez. Aktivität als 18 S und 28 S rRNS, kann also nicht ein Gemisch beider sein.
M II (der "messenger-Bereich") besitzt eine bis zu 100 % höhere spez. Aktivität als 28S rRNS. Der Bereich "5S rRNS" ist ebenfalls wesentlich höher spezifisch markiert als die 18S rRNS und 28S rRNS (Abb. 16).
Bei MII und 5S rRNS (ein Gemisch von "messenger RNS", tRNS und 5S rRNS) spielt aufgrund geringerer Halbwertszeiten gegenüber den ribosomalen Ribonukleinsäuren (Halbwertszeit von rRNS in normalen Leberzellen 5,5 Tage (4)) sicher eine Erhöhung der Radioaktivität im "Nukleotidpool" eine Rolle.
In diese Betrachtung nicht einbezogen sind die Effekte des Karzinogens auf andere Zellbausteine und deren Einfluß auf die rRNS-Neubildung.

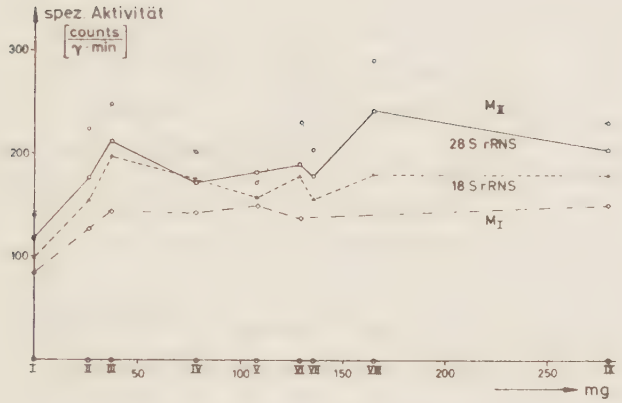


Abb. 16: Graphische Darstellung der Tabelle 1
Aufgetragen sind die spez. Aktivitäten der Tabelle 1 in Abhängigkeit von der in den Versuchspunkten pro Ratte insgesamt gegebenen Menge N-Nitrosomorpholin (in mg)

Tabelle 1 zeigt weiterhin, daß ca. 25-30 % der nach (4) vorhandenen rRNS durch die angewandte Methodik isoliert werden konnte. Aufgrund der durch die Reinigung entstandenen Verluste betrug die Menge der isolierten rRNS-Untereinheiten 35-40 % (28S rRNS) bzw. 18-20 % (18S rRNS) der Ausgangsmenge.

3.4. Diskussion von Gewebeschnitten

Die in jedem Versuch aufgearbeiteten Lebern von vier Tieren wurden zur Kontrolle der Homogenität histologisch untersucht. Es wurden Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung hergestellt. Das Gewebe stammte vom Leberrand des Hauptlappens. Die Ergebnisse dieser Schnitte mit H.-E.-Färbung und anderen Färbemethoden werden getrennt dargestellt (31).

Es ergab sich eine große Übereinstimmung zu Banasch und Müller (41), ein morphologischer Unterschied zwischen den Lebern von Tieren eines Versuches war nicht zu erkennen. Gegenüber der Arbeit von Banasch und Müller lag der Zeitpunkt der "Zellmetamorphose als Ausgangspunkt hepatozellulärer Karzinome" (41) in dieser Arbeit früher, was auf die Verwendung verschiedener Rattenstämme zurückzuführen sein könnte.

3.5. Ergebnisse der Mononukleotidanalysen

3.5.1. Mononukleotidgehalte der in Abb. 1 beschriebenen Bereiche

Wie zu erwarten war, ergaben sich für die 18S und die 28S rRNS bei der Bestimmung der Mononukleotide nach der alkalischen Hydrolyse mit 0,3 m KOH (18 h 37°C) keine wesentlichen Unterschiede in den durchgeführten Versuchen. Die in Tab. 2 aufgeführten Werte für den Kontrollversuch (I) sind die Mittelwerte dreier Aufarbeitungen mit einer Ab-

Tabelle 2a: 18 S rRNS

	C	A	G	U	$\frac{A+U}{G+C}$
I	26,6	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
II	26,3	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
III	25,3	22,0	31,3	21,4	0,77
IV	27,2	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
V	-	-	-	-	-
VI	24,0	22,6	[illegible]	21,6	[illegible]
VII	26,9	20,2	32,9	[illegible]	0,68
VIII	25,4	[illegible]	31,0	21,1	0,77
IX	26,1	22,7	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Ref. (28)	28,0	22,0	30,0	20,0	0,72

Tabelle 2b: 28 S rRNS

	C	A	G	U	$\frac{A+U}{G+C}$
I	31,0	18,7	32,9	17,6	0,57
II	30,3	18,1	34,4	17,2	0,55
III	30,2	18,9	34,0	16,9	0,56
IV	30,4	18,7	33,6	17,2	0,56
V	28,5	17,9	36,0	17,7	0,55
VI	28,1	17,1	38,9	15,8	0,49
VII	29,5	17,2	36,0	17,4	0,53
VIII	28,8	[illegible]	[illegible]	18,2	0,59
IX	29,7	18,9	33,9	[illegible]	0,57
Ref. (28)	30,0	18,0	33,0	19,0	0,59

Tabelle 2c: 5 S rRNS

	C	A	G	U	$\frac{A+U}{G+C}$
I	27,7	21,3	33,2	17,8	0,64
II	29,7	20,1	27,4	22,8	0,75
III	-	-	-	-	-
IV	27,7	20,9	29,8	21,6	0,74
V	19,8	19,8	38,5	21,8	0,71
VI	26,6	21,4	31,8	20,2	0,71
VII	25,4	22,4	30,3	21,9	0,80
VIII	25,5	20,7	32,0	21,6	0,73
IX	-	-	-	-	-

Tabelle 2d: MI

	C	A	G	U	$\frac{A+U}{G+C}$
I	30,8	23,5	22,7	23,1	0,87
II	26,2	21,8	31,8	20,2	0,72
III	26,2	21,5	32,7	19,6	0,70
IV	28,4	20,9	31,9	18,8	0,66
V	27,7	19,3	35,3	17,8	0,59
VI	22,9	25,1	28,0	24,0	0,96
VII	27,5	19,2	33,8	19,5	0,63
VIII	-	-	-	-	-
IX	-	-	-	-	-

Tabelle 2e: MII

	C	A	G	U	$\frac{A+U}{G+C}$
I	25,2	24,8	25,1	24,5	0,97
II	25,6	24,6	27,5	22,4	0,89
III	24,8	24,5	28,3	22,4	0,88
IV	26,5	23,7	27,7	22,2	0,85
V	27,1	21,4	33,9	19,7	0,70
VI	26,5	19,5	31,5	22,6	0,62
VII	25,8	22,3	31,5	21,4	0,78
VIII	26,3	23,0	28,5	22,2	0,83
IX	-	-	-	-	-

Tabelle 2 a - e: Mononukleotidzusammensetzungen der in Abb. 1 bezeichneten Bereiche:
C, A, G, U bedeuten die vier Mononukleotide
Hydrolyse- und Auftrennungsbedingungen s. Material und Methoden; Fehlerbetrachtung s. Text; die Werte sind ausgedrückt als Prozent Radioaktivität einer Auftrennung.

weichung von ± 1,5 % für jedes Mononukleotid. In jedem Versuch wurden für jedes Material Doppelbestimmungen durchgeführt, bei denen die Abweichung mit ± 0,3 % wesentlich geringer war als bei den Kontrollversuchen untereinander. Die in der Tabelle (2a, 2b) angegebenen Werte entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten, die für Säugetierorganismen für einzelne Nukleotide um bis zu 3,1 % schwanken.

3.5.2. Mononukleotide des Abbaus mit p-RNAse

Tab. 3 gibt den Gehalt an Cp und Up in dem Mononukleotidelutionsbereich der DEAE Sephadexauftrennung des Abbaus mit p-RNAse von 18S und 28S rRNS an. Der Wert (I) ist der Mittelwert zweier Versuche mit Doppelbestimmungen, also von je vier Auftrennungen. Alle anderen Werte sind die Mittelwerte zweier Auftrennungen.

Abb. 16 ist die graphische Darstellung dieser Ergebnisse am Beispiel von Cp, wobei die Werte auf die zu den einzelnen Versuchspunkten insgesamt pro Ratte gegebenen mg Nitrosomorpholin bezogen sind. Hierbei zeigt sich, daß der Gehalt an Cp gegenüber dem Kontrollwert in Abhängigkeit von der Nitrosomorpholingabe bei beiden untersuchten rRNS-Untereinheiten zuerst stark absinkt (Up also entsprechend zunimmt), dann jedoch wieder ansteigt und bei

Tabelle 3

	18 S rRNS			28 S rRNS		
	C	U		C	U	
I	58,5	41,5	± 0,9	69,7	30,3	± 1,2
II	55,8	44,2	± 1,2	65,7	34,3	± 1,2
III	54,8	45,2	± 1,0	66,5	33,5	± 1,0
IV	52,2	47,8	± 1,2	65,7	34,3	± 1,1
V	64,3	35,7	± 0,7	68,0	32,0	± 0,4
VI	56,6	43,4	± 0,8	70,0	30,0	± 0,6
VII	59,7	40,3	± 1,3	68,4	31,6	± 0,2
VIII	58,7	41,3	± 0,7	68,0	32,0	± 1,0
IX	wurde nicht ausgeführt					

Tabelle 3: Mononukleotidgehalte von 18 Mono P und 28 Mono P (s. Abb. 3)
Die über DEAE Sephadexsäulen gereinigten und anschließend entsalzten Mononukleotide des p-RNAse-Abbaus wurden papierelektrophoretisch getrennt und als Prozent Radioaktivität angegeben. Versuche I bis IX s. Abb. 14, der mittlere Fehler der Einzelmessung wurde nach $fm = \sqrt{\frac{\Sigma (\pm)^2}{n-1}}$ berechnet.

C, U sind wieder die Mononukleotide Cytidylsäure und Uridylsäure (CMP, UMP)

der 18S rRNS im Gegensatz zur 28S rRNS den Kontrollwert wieder erreicht. Ebenfalls unterschiedlich zwischen den beiden rRNS-Arten ist es, daß bei der 18S rRNS der Gehalt von mit p-RNAse hydrolysierbarem Cp zweimal den Kontrollwert übersteigt. Die Werte für die nicht mit Nitrosomorpholin behandelten Ratten (I) zeigen sehr gute Übereinstimmung mit Seeber und Busch (6)

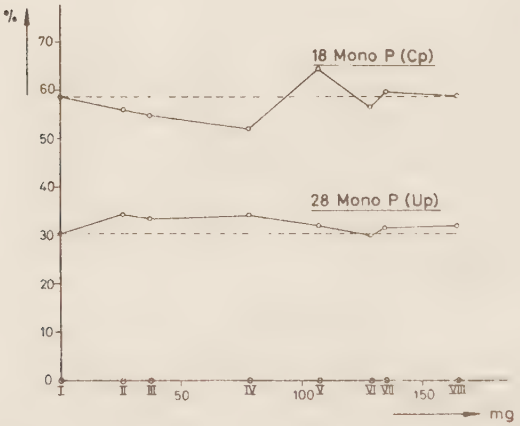


Abb. 17: Graphische Darstellung von Tab. 3
Aufgetragen sind je ein Mononukleotid des p-RNAse-Abbaus (von 28S rRNS 28 Mono P (Up) und von der 18S rRNS 18 Mono P (Cp)) gegen die an jedem Versuchspunkt insgesamt pro Ratte gegebenen Menge NNM (in mg)

3.6. Ergebnisse der DEAE Sephadexauftrennungen der drei Abbauwege

3.6.1. Auftrennungen der T_1-RNase-Hydrolysate auf DEAE Sephadexsäulen

Die in Abb. 2 angegebenen Elutionsbereiche werden für die 18S und die 28S rRNS der verschiedenen Versuche (Abb. 14) in Tab. 4 zusammengefaßt.

Angegeben sind die Radioaktivitätsgehalte der Nukleotidelutionsbereiche in Prozent der eluierten Gesamtaktivität. Über 95 % der aufgetragenen Radioaktivitäten wurden jeweils wieder von den Säulen eluiert.

Für die Werte der drei Kontrollversuche ist für jeden Elutionsbereich der mittlere Fehler der Einzelmessung angegeben.

Auffallend in Tab. 4 ist besonders der Wert II für beide untersuchten rRNS-Arten. Eine starke Veränderung zugunsten der Mono- bis Trinukleotide ist zu erkennen. Die Zunahme geht zu Lasten der aus höheren Oligonukleotiden zusammengesetzten Bereiche "Rest I" und "Rest II". Gleichgerichtete Veränderungen der einzelnen Versuchspunkte sind besonders in den Versuchen IV, V und VII der 18S rRNS und IV und V der 28S rRNS zu verzeichnen.

Hervorzuheben ist eine allgemeine Abflachung der Veränderungen einzelner Nukleotidbereiche bei andauernder Nitrosomorpholinfütterung.

	18 S rRNS						28 S rRNS					
	Mono	Di	Tri	Tetra	R I	RII	Mono	Di	Tri	Tetra	R I	R I
I	10,0 ± 1,45	12,0 ± 1,9	13,3 ± 1,71	13,0 ± 1,25	38,4 ± 3,32	10,0 ± 1,61	11,4 ± 0,84	13,9 ± 0,91	13,6 ± 0,54	11,4 ± 0,38	34,0 ± 0,36	15, ± 1,
II	20,7	25,0	21,2	11,8	16,2	4,7	20,3	23,8	17,3	11,0	14,6	12,
III	10,3	12,8	14,1	12,8	41,5	8,6	12,4	15,7	14,6	11,7	30,0	15,
IV	13,8	19,5	18,4	15,7	26,5	6,2	14,3	19,4	16,4	12,5	23,5	13,
V	12,7	16,0	14,5	11,7	31,6	13,5	12,8	15,7	14,3	11,6	30,9	14,
VI	9,8	13,8	14,8	13,4	40,8	7,4	12,3	16,9	14,9	11,5	29,7	14,
VII	14,4	21,2	18,5	13,8	21,3	10,8	11,8	14,5	13,4	10,9	31,3	18,
VIII	10,0	11,3	12,4	11,1	39,7	15,6	11,7	13,0	13,6	10,6	33,1	18,
IX	10,4	11,2	13,2	12,2	39,9	13,1	12,2	16,0	13,9	10,6	33,1	14,

Tabelle 4: Nukleotidelutionsbereiche der DEAE Sephadexsäulen nach Abbau der 18S und 28S rRNS mit T_1-RNAse.

Bezeichnungen der Elutionsbereiche s. Abb. 2; der Versuche s. Abb. 14.

Für den Versuch I ist der mittlere Fehler der Einzelmessung angegeben, die Werte sind Prozentzahlen der eluierten Gesamtaktivität.

3.6.2. Auftrennungen der p-RNase-Hydrolysate auf DEAE Sephadexsäulen

Tab. 5 faßt die auf DEAE Sephadexsäulen nach Länge der Nukleotide aufgetrennten 18S und 28S rRNS Hydrolysate der p-RNAse zusammen. Die Berechnung erfolgte analog der Tab. 4, die Benennungen der Bereiche sind Abb. 2 zu entnehmen. Auch bei diesen Auftrennungen betrugen die eluierten Gesamtaktivitäten nahezu 100 % der Auftragsaktivitäten.

Die Mittelwerte der drei Kontrollversuche für 18S und 28S rRNS stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten (6) (7) (12) - bei nicht identischen Abbaubedingungen.
Die Veränderungen innerhalb der Versuchspunkte der NNM-Fütterung sind in Tab. 5 erwartungsgemäß nicht so drastisch wie in Tab. 4, da die rRNS durch die Totalhydrolyse mit der p-RNAse kleinere Bruchstücke liefert, gleiche Veränderungen also relativ unbedeutender erscheinen müssen.
Jedoch erkennt man auch hier vielfältige Veränderungen bei beiden rRNS-Arten, wobei allgemein die Unterschiede bei der 18S rRNS stärker in Erscheinung treten.
Eine Korrelation der Veränderungen der Mononukleotidbereiche zu den Veränderungen der Cp (Up)-Gehalte dieser Bereiche ist nicht zu erkennen, d.h. eine Verschiebung im Verhältnis Cp/Up bei den eluierten Mononukleotiden zieht

	18 S rRNS						28 S rRNS					
	Mono	Di	Tri	Tetra	Rest I	RestII	Mono	Di	Tri	Tetra	Rest I	Res
I	24,3 ± 0,65	16,5 ± 0,42	19,0 ± 0,47	12,2 ± 0,67	23,9 ± 0,21	4,1 ± 0,30	24,8 ± 0,59	16,5 ± 0,21	16,3 ± 0,26	12,0 ± 0,37	23,2 ± 1,01	7, ± 0,
II	28,0	18,8	17,6	11,5	19,8	4,2	25,7	17,0	17,3	13,5	19,9	6,
III	23,8	16,7	19,7	12,4	23,7	3,7	25,1	17,0	17,1	11,5	21,2	8,
IV	24,7	16,6	19,4	12,2	21,5	5,6	25,7	17,0	17,3	13,5	19,9	6,
V	25,2	17,6	16,8	12,0	20,8	7,5	26,0	17,7	16,1	12,2	20,9	7,
VI	24,8	17,2	19,5	12,1	18,0	8,4	24,6	17,2	16,4	11,6	20,1	10,
VII	24,2	18,1	18,9	11,6	22,1	5,0	22,4	15,9	16,1	13,0	22,7	10,
VIII	23,0	18,0	19,1	12,1	21,9	5,9	22,1	18,3	17,4	12,6	21,5	8,
IX	wurde nicht ausgeführt											

Tabelle 5: Nukleotidelutionsbereiche der DEAE Sephadexsäulen nach Abbau der 18 S und 28 S rRNS mit p-RNAse.

Bezeichnungen der Elutionsbereiche s. Abb. 3, der Versuche Abb. 14.

Für den Versuch I ist der mittlere Fehler der Einzelmessung angegeben; die Werte sind Prozentzahlen der eluierten Gesamtaktivität.

nicht gleichzeitig eine Veränderung in der Anzahl der mit p-RNAse abbaubaren Sequenzen nach sich und umgekehrt. Dieses gilt wegen der steigenden Anzahl der Verbindungen in noch höherem Maße für die Di- und höheren Nukleotide. Daher sind detaillierte Aussagen über die dargestellten Zahlenwerte hinaus von den Tab. 4 und 5 nicht ableitbar.

3.6.3. Auftrennungen der alkalischen Hydrolysate von 18S und 28S rRNS auf DEAE Sephadexsäulen

Die im Gegensatz zu den alkalischen Hydrolysen für die Mononukleotidgehaltsbestimmung im "Hydrolysepuffer" gelösten 18S und 28S rRNS-Arten zeigten bei den angewandten Bedingungen der alkalischen Hydrolyse (0,3 mKOH 18 h 37°C) nur einen partiellen Abbau. Daher sind die in Tab. 6 angegebenen Werte nur unter den angegebenen Bedingungen vergleichbar.

Nach Bock (26) soll bei niedrigen Temperaturen und hohen Salzkonzentrationen bei der RNS-Hydrolyse ein beträchtliches "stacking" der Basen A und C erfolgen. Es bestand daher die Hoffnung, durch die angewandten Bedingungen weitere Unterschiede im Aufbau der rRNS-Arten zu erfassen. Wie die Tab. 6 zeigt, wurde dieser Versuchsansatz bei zwei Versuchspunkten nicht durchgeführt. Die teilweise sehr großen Unterschiede in der Angreifbarkeit der 18S und 28S rRNS gegenüber der KOH-Behandlung und auch die Streuung der Werte der Mononukleotidanalysen deuten

	18 S rRNS							28 S rRNS						
	Mono	C	A	G	U	Di	Rest	Mono	C	A	G	U	Di	R
I	86,2	29,4	23,4	26,7	20,5	11,0	2,8	83,4	34,7	19,5	25,5	20,2	13,8	2
II	86,0	28,9	22,7	26,0	22,4	12,0	2,0	84,3	35,1	19,6	29,8	15,5	13,4	2
III	83,2	28,7	21,3	26,1	23,9	14,3	2,5	87,3	32,9	17,7	30,9	18,5	11,2	1
IV	82,6	31,5	17,9	29,1	21,6	13,7	3,7	76,6	33,0	16,6	33,1	17,3	17,0	6
VI	76,7	29,0	17,8	29,5	23,7	18,5	4,7	84,6	33,8	19,4	26,5	20,3	13,2	2
VIII	92,1	27,6	20,5	29,6	22,3	5,9	2,0	91,3	31,7	17,2	33,4	17,7	7,6	1
IX	78,1	28,5	17,3	29,3	24,9	17,7	4,3	79,0	36,0	17,9	25,7	20,4	17,5	3

Tabelle 6: Nukleotidelutionsbereiche der DEAE Sephadexsäulen nach alkalischer Hydrolyse der 18 S und 28 S rRNS und Auftrennungen der isolierten Mononukleotide.

Bezeichnungen der Elutionsbereiche s. Abb. 4, der Versuche s. Abb. 14.

Die Versuche V und VII wurden nicht durchgeführt.

jedoch weniger auf entsprechende Unterschiede im Aufbau der rRNS-Arten als auf Nebenreaktionen hin. Da in diesem Versuchsansatz auch von dem Kontrollwert für die DEAE Sephadex-Auftrennung nur eine Bestimmung durchgeführt wurde, konnte keine Fehlerbetrachtung erfolgen. Die Werte für die Mononukleotidanalysen waren wieder Mittelwerte zweier Bestimmungen, bei denen die maximale Abweichung 0,5 % für ein Mononukleotid betrug.

3.7. Ergebnisse der Dinukleotidanalysen

3.7.1. Dinukleotidanalysen des T_1-RNAse-Abbaus

In Tab. 7 sind die Prozentgehalte der drei Dinukleotide des T_1-RNAse-Abbaus von 18S und 28S rRNS relativ zur Summe dieser Dinukleotide mit dem mittleren Fehler der Einzelmessung angegeben. Die Werte sind die Mittelwerte von sechs Einzelmessungen bei Versuch I und zwei bis drei Einzelmessungen bei den anderen Versuchen.
Die Werte für den Kontrollversuch der 28S rRNS unterscheiden sich von den Literaturwerten (12), was wahrscheinlich auf die Auftrennungsmethodik zurückzuführen ist.
Augenfällig sind die teilweise sehr großen Differenzen der einzelnen Dinukleotidgehalte in den Nitrosomorpholinversuchen relativ zu den Kontrollversuchen.

18 Di T_1

	CG		AG		UG	
I	40,0	± 1,32	29,8	± 1,59	30,2	± 0,44
II	21,8	± 0,4	54,6	± 0,1	23,7	± 0,3
III	11,3	± 0,1	55,3	± 0,0	33,4	± 0,1
IV	36,6	± 0,6	43,6	± 0,3	19,8	± 0,3
V	45,2	± 0,5	30,4	± 0,3	24,4	± 0,2
VI	33,1	± 0,2	42,4	± 0,2	24,5	± 0,1
VII	30,9	± 0,5	50,3	± 0,3	19,5	± 0,8
VIII	39,5	± 0,6	34,5	± 0,6	26,0	± 0,0
IX	39,7	± 0,4	32,0	± 0,1	28,3	± 0,3

28 Di T_1

	CG		AG		UG	
I	45,8	± 0,5	28,1	± 0,1	26,1	± 0,5
II	34,2	± 0,4	48,1	± 1,0	17,7	± 0,9
III	46,6	± 0,8	32,1	± 1,0	21,3	± 0,1
IV	42,4	± 0,6	36,5	± 0,4	21,1	± 0,2
V	49,5	± 0,7	30,1	± 0,5	20,4	± 0,2
VI	44,7	± 0,6	30,7	± 0,7	24,6	± 0,1
VII	46,5	± 0,7	32,4	± 0,6	21,1	± 0,1
VIII	43,1	± 0,2	30,7	± 0,2	26,2	± 0,0
IX	50,4	± 0,1	26,3	± 0,1	23,3	± 0,0

Tabelle 7: Dinukleotidzusammensetzung der 18 S und 28 S rRNS nach T_1-RNAse-Abbau.
Die T_1-RNAse-Hydrolysate wurden auf DEAE-Sephadexsäulen aufgetrennt, die Dinukleotidelutionsbereiche entsalzt und elektrophoretisch aufgetrennt.
CG, AG, UG sind die durch T_1-RNAse entstandenen Dinukleotide. Bezeichnung der Versuche s. Abb. 14; für jeden Wert ist der mittlere Fehler der Einzelmessung angegeben. Die Werte sind ausgedrückt als Prozent Radioaktivität der einzelnen Papierbereiche von der Summe der Radioaktivitäten der drei Dinukleotidbereiche.

Abb. 18 zeigt, daß diese Veränderungen besonders groß sind im Anfangsstadium der Nitrosomorpholinfütterung bei der 18S rRNS; zu bemerken ist

der Übergang von CG zu AG in den
Versuchen II, III, VI, VII,
der Übergang von UG zu AG in
allen Versuchen (bis auf Versuch III, V)
und
der Übergang von UG zu CG in dem Versuch V.

Eigenartig erscheint hierbei der Übergang von Pyrimidinnukleotiden zu Purinnukleotiden. Eine chemische Umwandlung von einer Base in eine andere an der DNS aber ist nur innerhalb der beiden heterozyklischen Basenreihen denkbar. Gleiches gilt für die Übergänge der Dinukleotide bei der Darstellung der Ergebnisse von 28 Di T_1. Auch hier überwiegen die Übergänge UG → AG und CG → AG gegenüber dem Übergang UG → CG (s. Diskussion 4.3.).
Hinweise zu einer anderen oder zusätzlichen Interpretation der in Tab. 7 gegebenen Werte zeigten sich bei den Dinukleotidanalysen der NNM-Versuche. Abb. 19 zeigt eine solche Auftrennung von 28 Di T_1 der Versuche III und IV. Gegenüber Abb. 6 erscheinen neben den Dinukleotiden CG, AG und UG weitere Nukleotide. Da diese Nukleotide als Dinukleotide von der DEAE Sephadexsäule eluiert wurden,

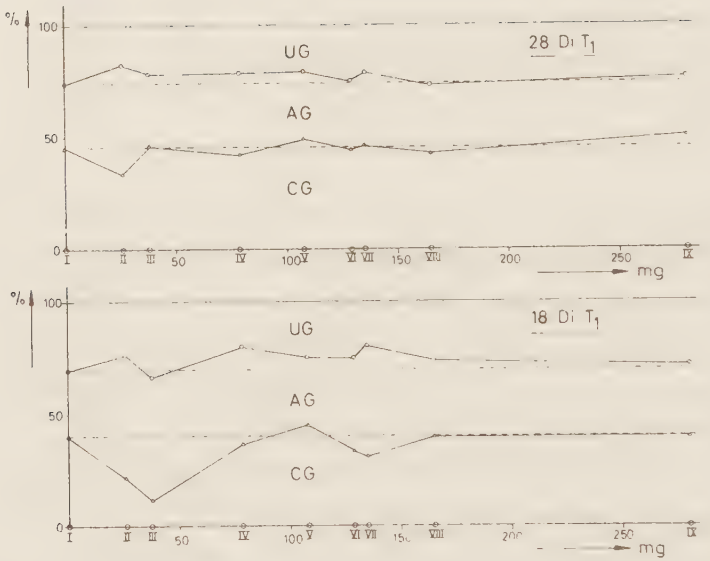


Abb. 18: Graphische Darstellung der Tabelle 7
Darstellung der Dinukleotidgehalte CG, AG und UG in Abhängigkeit von der in den Versuchspunkten pro Ratte insgesamt gegebenen Menge NNM (in mg).

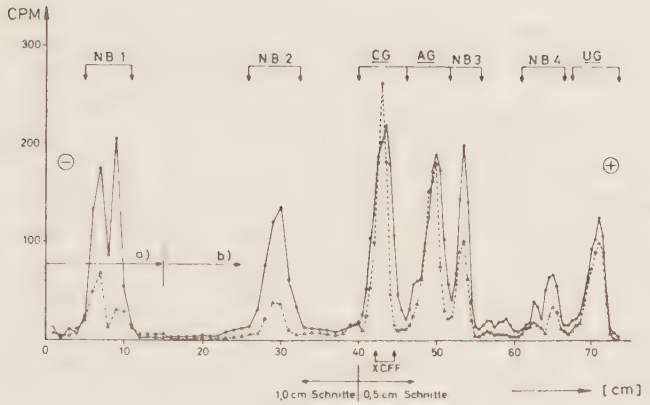


Abb. 19: Hochspannungspapierelektrophoresen der durch T_1-RNAse-Abbau gewonnenen Dinukleotide

———— 28 Di T_1 des Versuches IV

-------- 28 Di T_1 des Versuches III

Bedingungen und Bezeichnungen s. Abb. 6A
N.B. 1 - 4 stellen die Nukleotidbereiche 1 - 4 dar (s. Text).

müssen sie als anormale Produkte der T_1-RNAse-Hydrolyse angesehen werden. Mitgeschleppte Mohonukleotide sind ebenso unwahrscheinlich (s. Abb. 2) als Erklärung wie ein Zerfall von Dinukleotiden beioder nach der Entsalzung, da das entstandene Gp in dreifacher Menge der anderen Mononukleotide hätte vorliegen müssen. Da die Herkunft dieser anormalen Dinukleotide somit ungeklärt ist, besteht die Schwierigkeit einer quantitativen Angabe.

Wären diese Nukleotide in ihrer Laufgeschwindigkeit veränderte "normale Dinukleotide" des T_1-Abbaus, dann gäbe es die Möglichkeit sie in Prozenten der Gesamtaktivität der Auftrennung anzugeben. Wären diese Bereiche jedoch lediglich Steigerungen von im Kontrollwert bereits vorhandenen Dinukleotiden, läge es nahe, sie als Zunahme in Prozent relativ zum Normalwert anzugeben.
Falls die Nukleotide jedoch dadurch entstanden wären, daß die T_1-RNAse aufgrund von Basenveränderungen zusätzliche Bindungen gespalten hat, wäre es gerechtfertigt, sie als Steigerung in Prozent relativ zur Gesamtaktivität der "normalen" Dinukleotide anzugeben.
Die letzte Möglichkeit wurde in Tab. 8 gewählt. Angegeben wurde also die Radioaktivität der Nukleotidbereiche 1 bis 4 (N.B. 1 - N.B. 4) relativ zur Summe der Radioaktivitäten der Dinukleotide CG, AG und UG.
Die in der Abb. 19 dargestellten beiden vorderen Elektrophoresebereiche wurden zusammengefaßt zum N.B. 1, da eine zuverlässige Trennung aufgrund kurzer Laufzeit nicht immer zu erreichen war. Die Tab. 8 zeigt fast gleichgerichtete Veränderungen der N.B. 1-4 bei 18S und 28S rRNS. Wie schon bei den Abweichungen der "normalen" Dinukleotide sind die Nukleotidbereiche in stärkerem Maße bei 18S rRNS verändert. Für die Nukleotidbereiche 1, 2 und 4 erkennt man einen sich abflachenden Wellenverlauf der Abweichungen , für den N.B. 3 nur ein Maximum im Versuch III (18S rRNS) bzw.

18 Di T_1

	NB 1		NB 2		NB 3		NB 4	
I	1,5	± 0,8	2,5	± 0,6	3,0	± 0,5	4,5	± 0,9
II	39,7	± 0,7	37,3	± 0,9	22,8	± 1,2	41,7	± 0,7
III	33,5	± 1,2	19,5	± 1,4	62,1	± 1,4	12,5	± 0,6
IV	40,8	± 1,4	35,0	± 1,2	42,8	± 1,1	29,1	± 1,3
V	16,8	± 1,1	14,3	± 0,9	21,1	± 0,6	8,4	± 0,4
VI	4,5	± 0,4	3,6	± 0,1	4,0	± 0,2	6,3	± 0,3
VII	2,0	± 0,3	15,7	± 0,5	5,7	± 1,2	13,7	± 0,4
VIII	4,2	± 0,6	8,4	± 0,3	6,1	± 0,4	8,3	± 0,5
IX	6,3	± 0,7	5,2	± 0,3	7,8	± 0,5	7,2	± 0,6

28 Di T_1

	NB 1		NB 2		NB 3		NB 4	
I	0,5	± 0,2	1,0	± 0,1	2,5	± 0,2	4,0	± 0,3
II	19,8	± 1,5	15,3	± 0,4	7,3	± 0,6	15,2	± 0,7
III	10,3	± 0,6	6,3	± 1,3	14,0	± 0,9	12,2	± 1,3
IV	21,3	± 1,1	15,9	± 0,6	20,3	± 0,9	18,6	± 0,8
V	12,1	± 1,0	7,2	± 0,4	9,6	± 0,8	7,7	± 0,6
VI	5,1	± 0,4	3,6	± 0,4	5,4	± 0,3	5,6	± 0,4
VII	3,2	± 0,3	3,9	± 0,2	3,8	± 0,5	7,7	± 1,3
VIII	5,1	± 0,4	3,7	± 0,3	4,1	± 0,5	8,3	± 0,9
IX	7,0	± 0,2	3,9	± 0,1	4,9	± 0,6	8,6	± 0,2

Tabelle 8: Anteile der Nukleotidbereiche 1-4 (s. Abb. 19) an der Summe der Dinukleotide (CG + AG + UG) aus dem T_1-RNAse-Abbau
Die Werte sind die Prozente an Radioaktivität der einzelnen Nukleotidbereiche relativ zur Summe der Radioaktivitäten der Dinukleotidbereiche. Zu jedem Wert wurde der mittlere Fehler der Einzelmessung angegeben.

IV (283 rRNS). Die Normalwerte werden in keinem Versuch wieder erreicht (Abb. 20).

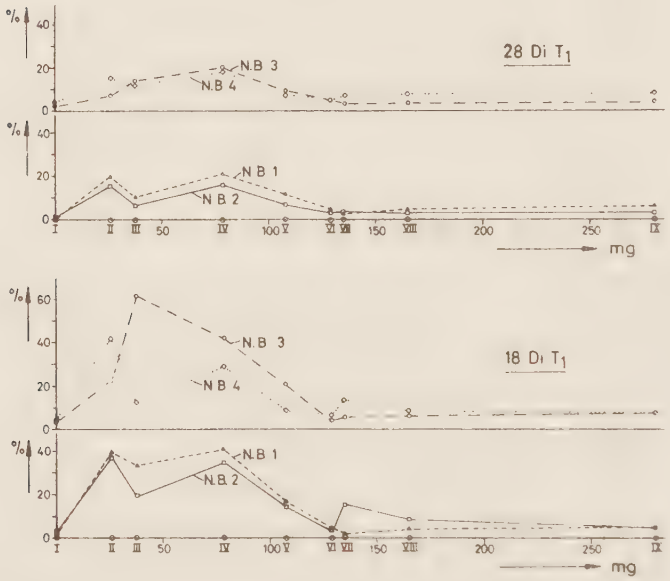


Abb. 20: Graphische Darstellung der Tabelle 8
Aufgetragen wurden die in Tab. 8 angegebenen Prozentzahlen gegen die pro Ratte in jedem Versuchspunkt insgesamt gegebene Menge NNM (in mg) (s. Abb. 14).

Die Werte für Versuch I stellen wieder die Mittelwerte der Radioaktivitäten der Nukleotidbereiche aus sechs Bestimmungen dar. Dazu muß erwähnt werden, daß hierbei (s. Abb. 6A) die Nukleotidbereiche nur andeutungsweise erkennbar waren. Die Charakterisierung dieser Nukleotide über die alkalische Hydrolyse und den Abbau mit Phospho-

diesterase ergab keine klaren Ergebnisse (s.u.).
Andere Untersuchungen konnten mit diesem radioaktiven Material wegen der geringen Mengen nicht durchgeführt werden.

3.7.2. Dinukleotidanalysen des p-RNAse-Abbaus

In Tab. 9 fehlt der Versuch IX, die Werte des Versuchs I sind wieder die Mittelwerte dreier Aufarbeitungen und sechs Bestimmungen. Angegeben ist wieder der mittlere Fehler der Einzelmessung. Die graphische Darstellung der Tabelle erfolgte in Abb. 21.
Folgende Tatsachen können Tab. 9 für 18 Di P entnommen werden:

a) die Erhöhung des Gehaltes an AC und GC in den Versuchen II - IV geht einher mit einer Verringerung des Gehaltes an AU und GU,

b) die Erhöhung von GC im Versuch V geht zu Lasten von AC und AU,

c) die Versuche VI und VII besitzen die Werte der Kontrollversuche und

d) die Erhöhung des GC-Gehaltes in Versuch VIII geht einher mit einer Verringerung des AU-Gehaltes.

18 DiP

	AC		GC		AU		GU	
I	23,2	± 1,8	35,1	± 1,2	19,3	± 1,3	22,5	± 2,0
II	27,2	± 0,4	38,3	± 0,5	16,5	± 0,7	18,0	± 0,6
III	27,7	± 0,1	37,6	± 0,1	16,1	± 0,8	18,7	± 0,6
IV	31,5	± 0,3	36,7	± 0,5	15,7	± 0,8	16,1	± 1,0
V	18,8	± 0,6	42,4	± 0,5	13,5	± 0,1	25,4	± 0,1
VI	23,3	± 1,2	35,7	± 1,3	19,5	± 0,6	21,3	± 0,8
VII	22,5	± 0,1	37,5	± 0,1	17,2	± 0,0	22,8	± 0,1
VIII	23,2	± 0,6	39,8	± 0,1	15,6	± 0,1	21,4	± 0,7

28 DiP

I	18,7	± 0,7	48,6	± 1,1	10,7	± 1,1	22,0	± 1,0
II	18,8	± 0,9	49,4	± 1,4	8,5	± 0,4	23,3	± 0,1
III	15,7	± 0,7	49,5	± 1,2	9,6	± 0,4	25,2	± 1,5
IV	21,6	± 0,6	49,6	± 1,0	7,2	± 0,6	21,6	± 1,0
V	17,5	± 0,4	42,2	± 0,1	18,9	± 0,3	21,4	± 0,3
VI	14,2	± 1,0	48,0	± 0,7	11,0	± 0,2	26,8	± 0,1
VII	18,2	± 0,4	43,1	± 0,1	14,1	± 0,1	24,6	± 0,6
VIII	19,1	± 0,1	45,0	± 0,4	16,6	± 0,4	19,3	± 0,1

Tabelle 9: Dinukleotidzusammensetzungen der 18S und 28S rRNS nach p-RNAse-Abbau.
Die p-RNase-Hydrolysate wurden auf DEAE Sephadexsäulen aufgetrennt, die Dinukleotidelutionsbereiche entsalzt und elektrophoretisch aufgetrennt. AC, GC, AU und GU sind die durch die p-RNAse entstandenen Dinukleotide. Bezeichnung der Versuche s. Abb. 14; für jeden Wert ist der mittlere Fehler der Einzelmessung angegeben. Die Werte sind ausgedrückt als Prozent Radioaktivität der einzelnen Papierbereiche von der Summe der Radioaktivität der vier Dinukleotidbereiche.

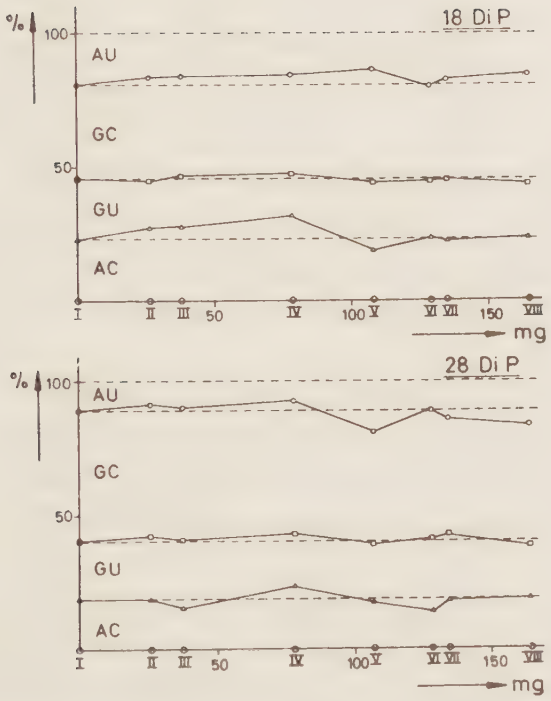


Abb. 21: Graphische Darstellung der Tabelle 9 Darstellung der Dinukleotidgehalte AC, GC, AU und GU (in %) in Abhängigkeit von der in den Versuchspunkten pro Ratte insgesamt gegebenen Menge NNM (in mg).

Bei 28 Di P geht

Verringerung einher mit einer Erhöhung im Versuch

AC	GU	III
AU und GU	GC und AC	IV
GC	AU	V
AC und AU	GU und GC	VI
GC und GU	AU und AC	VII und VIII

Insgesamt ergibt sich eine komplementäre Verschiebung zwischen AC und GU einerseits sowie AU und GC andererseits, da die Summe beider Dinukleotidpaare für jeden Versuch (bei 18S und 28S rRNS) den Wert des Kontrollversuches erreicht.

Wie bei den Dinukleotiden des T_1-RNAse-Abbaus waren auch bei den Dinukleotiden des p-RNAse-Abbaus radioaktive Nukleotidbereiche auf den Elektrophoresepapieren zu erkennen, die in den Kontrollversuchen nur andeutungsweise oder nicht vorhanden waren.

Die in Abb. 22 mit N.B. 1 bis N.B. 3 bezeichneten Bereiche waren sowohl bei den Dinukleotiden der 18S als auch bei der 28S rRNS vorhanden und in den Versuchen mengenmäßig unterschiedlich. Einen Überblick darüber gibt Tab. 10, in der - wie in Tab. 8 - der Radioaktivitätsgehalt der Nukleotidbereiche 1-3 relativ zur Radioaktivität der Summe der vier "normalen Dinukleotide" angegeben wurde.

18 Di P

	NB 1		NB 2		NB 3	
I	0,8	± 0,2	3,1	± 0,4	2,5	± 0,3
II	4,6	± 0,5	7,8	± 0,3	4,3	± 0,1
III	6,5	± 0,2	11,4	± 0,7	8,3	± 0,6
IV	14,2	± 0,3	14,9	± 0,4	11,7	± 0,2
V	6,1	± 0,4	8,2	± 0,2	5,4	± 0,6
VI	3,2	± 0,6	4,5	± 0,4	3,0	± 0,2
VII	2,4	± 0,5	4,6	± 0,2	2,2	± 0,0
VIII	3,0	± 0,4	7,2	± 0,2	3,6	± 0,2

28 Di P

	NB 1		NB 2		NB 3	
I	1,3	± 0,4	4,1	± 0,2	2,0	± 0,3
II	3,8	± 0,2	5,8	± 0,3	3,3	± 0,1
III	11,2	± 0,2	10,6	± 0,7	7,2	± 0,4
IV	23,1	± 0,4	24,0	± 0,3	14,5	± 0,5
V	10,3	± 0,3	7,0	± 0,3	7,4	± 0,5
VI	3,2	± 0,6	4,3	± 0,2	3,1	± 0,4
VII	8,7	± 0,3	7,7	± 0,3	4,7	± 0,2
VIII	7,4	± 0,4	8,0	± 0,7	8,1	± 0,2

Tabelle 10: Anteile der Nukleotidbereiche 1 - 3 (s. Abb. 22) an der Summe der Dinukleotide (AC + GC + AU + GU) aus dem p-RNAse-Abbau.
Die Werte sind die Prozente an Radioaktivität der einzelnen Nukleotidbereiche relativ zur Summe der Radioaktivitäten der Dinukleotidbereiche. Zu jedem Wert wurde der mittlere Fehler der Einzelmessung angegeben.

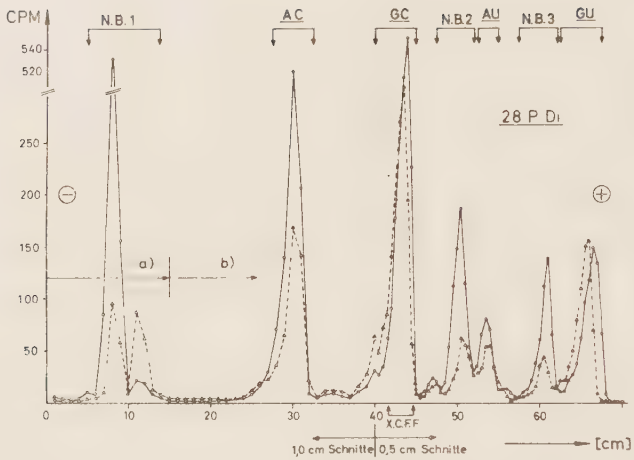


Abb. 22: Hochspannungspapierelektrophorese der durch p-RNAse-Abbau gewonnenen Dinukleotide

———— 28 Di P des Versuches IV

------- 28 Di P des Versuches III

Bedingungen und Bezeichnungen s. Abb. 6B

N.B. 1-3 stellen die Nukleotidbereiche 1-3 dar (s. Text).

In Abb. 23 ist Tab. 10 graphisch dargestellt. Sowohl bei den Veränderungen der N.B. 1-3 bei der 18S rRNS als auch der 28S rRNS erkennt man einen mehr oder weniger linearen Anstieg bis zum Versuch IV, der gefolgt ist von einem Abfall der Veränderungen bis zum Versuch VI (VII).

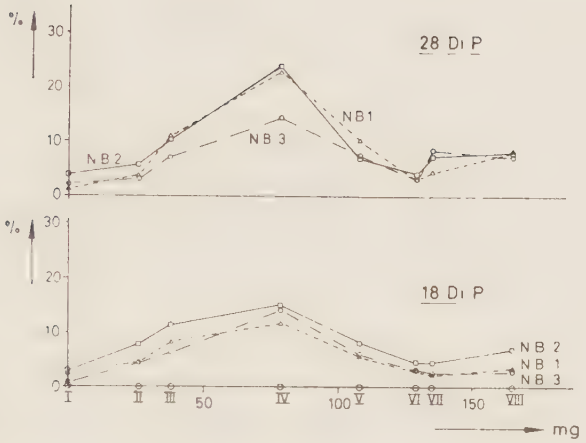


Abb. 23: Graphische Darstellung der Tabelle 10 (sonst wie Abb. 20)

Im Gegensatz zur Tab. 8 sind in Tab. 10 die stärkeren Veränderungen bei der 28S rRNS. Ein Vergleich von Abb. 23 mit Abb. 21 zeigt keine Korrelation der Dinukleotidverschiebungen mit den Veränderungen der Nukleotidbereiche. Versuche zur Aufklärung der durch den p-RNAse Abbau entstandenen "anormalen" Dinukleotide siehe 3.12.

3.7.3. Darstellung der alkalistabilen Dinukleotide

Das unter 3.6.3. über die alkalischen Hydrolysate Gesagte gilt auch für die über DEAE Sephadex abgetrennten Dinukleotide der alkalischen Hydrolysate von 18S und 28S rRNS. Wegen der geringen Materialmengen bei den Dinukleo-

tiden waren nur Einzelbestimmungen möglich. Die Dinukleotide wurden auf 3 MM-Papier einer Elektrophorese von 70 cm (S.F.) unterworfen. Eine weitere Analyse der "Spots" war wegen zu geringer Aktivität nicht möglich, so daß auf diesen Teil der Arbeit wegen zu geringer Aussagekraft nicht weiter eingegangen werden soll.

Abb. 24 zeigt die elektrophoretische Auftrennung von 28 Di A.H. eines Kontrollversuches zur Demonstration. Zehn alkalistabile Dinukleotide entsprechen den aufgetrennten zehn Bereichen I - X.

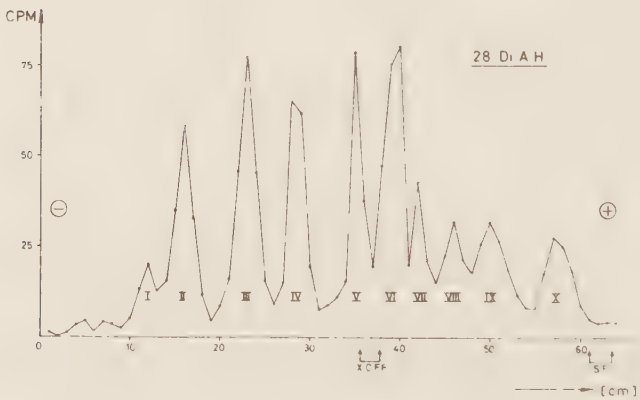


Abb. 24: Hochspannungspapierelektrophorese von "alkalistabilen" Dinukleotiden
Bedingungen der alk. Hydrolyse s. Text.
Die römischen Ziffern I bis X entsprechen wahrscheinlich den durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten auftrennbaren Dinukleotiden. Bedingungen der Elektrophorese und Benennungen s. Material und Methoden.

3.8. Ergebnisse der Trinukleotidanalysen

Vorbemerkung:

Im Gegensatz zu den Dinukleotidanalysen konnten bei der Analyse von Trinukleotiden (ebenso von Tetranukleotiden) auf DEAE Papier nur je eine Bestimmung für 18S und 28S rRNS erfolgen, da ein Autoradiogramm wegen zu geringer Radioaktivität (Abb.2, Abb.3,Tab.4, Tab.5) sonst nicht hätte hergestellt werden können. Die Aussagekraft der Werte ist daher gegenüber den Werten der Dinukleotide gemindert und nur im Zusammenhang mit diesen brauchbar.

Da zu Beginn dieser Arbeit die Trinukleotidanalysen des p-RNAse-Abbaus und des T_1-RNAse-Abbaus auf DOWEX 1x2 Säulen durchgeführt wurden, diese Auftrennungen jedoch nicht vergleichbar waren mit der ionophoretischen Auftrennung hinsichtlich der Trennschärfe, wurden diese Versuchsergebnisse in die Tabellen 11 und 12 nicht mit aufgenommen (Versuche V, VII, VIII).

3.8.1. Trinukleotidanalysen des T_1-RNAse- Abbaus

Wie schon bei den Dinukleotiden waren auch bei den Trinukleotiden die Veränderungen einzelner Verbindungen stärker in der T_1-RNAse-Reihe als in der p-RNAse-Reihe. Durch das Entstehen von "Extraspots" unter NNM litt die eindeutige Zuordnung einzelner Trinukleotide.

Trotz dieser Einschränkung und einer Vergrößerung der

Fehlerbreite (Tab. 11) ergaben sich doch große Unterschiede in den aufgeführten Versuchen.
Eine Betrachtung von Verschiebungen der einzelnen Trinukleotidgehalte in Tab. 11 war wegen der Anzahl der möglichen Wechselwirkungen nicht sinnvoll.
Eine bessere Vorstellung über die Veränderungen und das Entstehen von "Extraspots" als Tab. 11 gibt Abb. 25, in der die Autoradiogramme der Ionophoresen abgebildet sind (28 Tri T_1). Die Zuordnung der"Spots" zu den definierten Verbindungen geschah nach (1) und eigenen Analysen. Die "normalen" Trinukleotide eines T_1-RNAse-Abbaus wurden durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Abb. 25 unterstreicht in Korrelation zu Abb. 20 die Tendenz der Aufspaltung "normaler" Trinukleotide auf zusätzliche Nukleotidbereiche in den Versuchen II - IV. Besonders ausgeprägt war diese Tendenz in Versuch IV (Abb. 25), in dem bei 28 Tri T_1 nicht weniger als sieben zusätzliche "Spots" auftraten.

28 Tri T_1

	UUG	AUG	UAG	(CU)G	AAG	ACG	CAG	CCG
I	4,5 ± 1,8	6,5 ± 1,6	4,0 ± 1,4	26,9 ± 2,2	7,0 ± 2,5	10,9 ± 2,3	32,8 ± 2,6	4,7 ± 1,7
II	4,5	7,3	3,8	36,1	6,8	16,5	17,4	7,6
III	5,8	6,6	4,0	27,5	8,9	13,4	19,4	14,5
IV	3,7	7,0	3,8	32,7	6,8	9,7	16,4	19,9
VI	7,4	9,0	6,4	27,2	5,8	10,5	26,7	7,1
X	5,2	7,2	6,1	26,3	8,1	10,6	29,7	6,7

18 Tri T_1

	UUG	AUG	UAG	(CU)G	AAG	AGC	CAG	CCG
I	5,8 ± 1,5	8,0 ± 1,4	4,9 ± 1,1	24,1 ± 1,8	7,5 ± 2,1	13,3 ± 1,8	29,1 ± 1,7	7,3 ± 1,4
II	2,9	6,1	4,5	18,4	11,2	14,4	18,9	23,6
III	6,8	10,8	4,6	25,5	14,1	13,8	13,8	10,6
IV	5,0	10,7	5,4	28,0	8,9	10,2	13,0	18,8
VI	11,4	16,7	7,9	23,5	12,0	14,4	21,7	7,5
X	6,4	9,0	5,7	24,2	10,9	12,9	19,8	11,1

Tabelle 11: Zusammensetzungen der Trinukleotide der 18S und 28S rRNS nach T_1-RNAse-Hydrolyse.

Die Trinukleotidelutionsbereiche der DEAE Sephadexsäulen wurden entsalzt und auf Ionenaustauschpapier einer Elektrophorese unterworfen. Die Werte sind Prozentzahlen der durch Autoradiogramme identifizierten Radioaktivitätsbereiche relativ zur Summe der Radioaktivitäten der Trinukleotide (s. Abb. 25). Für den Versuch I ist der Mittelwert zweier Versuche mit der Abweichung angegeben; fehlende Versuche s. Vorbemerkung 3.8.

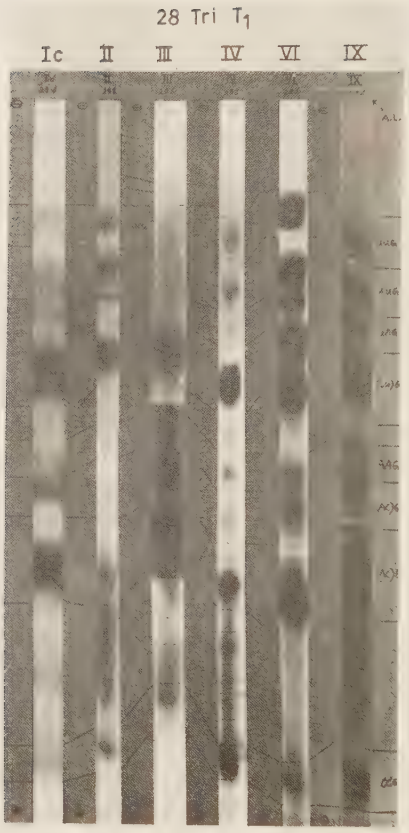


Abb. 25: Vergleich von Trinukleotidauftrennungen verschiedener Versuche (vergl. Text) von 28 Tri T_1; A.L. = Auftragslinie

3.8.2. Trinukleotidanalysen des p-RNAse-Abbaus

In Tab. 12 fällt auf, daß die hierunter 2.2.9. beschriebene Methodik der Trinukleotidanalyse andere Werte liefert

18 Tri P

	GGU	AGU+ GAU	GGC	AAU	AGC+ GAC	AAC
I	8,1 ± 0,3	21,5 ± 0,6	15,3 ± 0,7	11,4 ± 0,3	28,2 ± 0,7	15,5 ± 0,8
II	6,6	17,0	13,5	9,6	26,5	26,9
III	7,5	25,5	6,8	12,5	23,2	24,4
IV	6,8	25,6	5,8	15,1	24,3	22,3
VI	9,1	23,9	11,9	10,5	28,1	16,5
Ref.(3)(7)	9,0	23,2	18,2	11,0	24,7	14,0

28 Tri P

	GGU	AGU+ GAU	GGC	AAU	AGC+ GAC	AAC
I	8,7 ± 0,2	20,9 ± 0,5	16,2 ± 1,1	8,1 ± 0,8	31,0 ± 0,2	15,1 ± 0,8
II	6,6	20,1	14,9	7,5	32,6	18,3
III	5,4	24,3	11,1	9,6	27,7	22,0
IV	8,6	19,6	15,2	8,1	29,2	19,3
VI	11,0	21,0	21,7	5,6	28,1	12,2
Ref.(3)(7)	11,6	18,8	26,5	6,9	25,7	9,9

Tabelle 12: Zusammensetzung von Trinukleotiden der 18 S und 28 S rRNS nach p-RNAse-Abbau.

Die Werte sind Prozentzahlen der Radioaktivitäten einzelner Trinukleotide relativ zur Summe der Radioaktivitäten der Trinukleotide (s. Abb. 8); sonst s. Legende zu Tab. 11

als in der Literatur beschrieben, die durch Auftrennung der Trinukleotide auf DOWEX Säulen erhalten wurden (s. Vorbemerkung 3.8.). Besonders groß sind diese Unterschiede bei der 28S rRNS und hier um bis zu 10 % für ein einzelnes Trinukleotid. Ein Grund für diese Unterschiede mag darin liegen, daß durch die Spülungsvorgänge die an das Ionenaustauschharz schwach gebundenen Trinukleotide AAC und (AG)C vorzeitig ausgewaschen werden.
Die Unterschiede im Gehalt einzelner Trinukleotide zwischen den aufgeführten Versuchen sind nicht leicht interpretierbar, da vielfältige Umwandlungen zwischen den acht Trinukleotiden des p-RNAse-Abbaus möglich sind und die Trinukleotide AGU und GAU sowie GAC und AGC zu (AG)U bzw. (GA)C zusammengefaßt wurden.

Wie schon bei den Dinukleotiden ergaben sich auch bei den Trinukleotidanalysen des p-RNAse-Abbaus "Extraspots" in den Versuchspunkten II - VI. Diese "Extraspots" lagen besonders im anodischen Bereich des DEAE Papiers, was dem kathodischen Teil des 3 MM Papiers bei der Hochspannungselektrophorese entspricht. Die Anzahl dieser "Extraspots" nahm zu bis zu den Versuchen III und IV bei beiden rRNS-Arten und war dann wieder rückläufig. Abb. 8 zeigt diese "Spots" von 28S rRNS des Versuches IV mit der Bezeichnung 1-5. Da die Struktur dieser Nu-

kleotide nicht eindeutig geklärt werden konnte und die reduzierte Anzahl der Versuche eine Darstellung wie bei den Dinukleotiden nicht erlaubte, wird auf die quantitative Wiedergabe - wie schon bei 18 und 28 Tri T_1 - verzichtet. Jedoch besteht eine Verbindung zwischen der Laufgeschwindigkeit und der relativen Steigerung des Gehaltes von "Extraspots" 5 und dem N.B. 1 von 28 Di T_1. Zusammenfassend konnte von den Trinukleotidanalysen von 18 (28) Tri T_1 und 18 (28) Tri P festgestellt werden, daß sich bei ihnen fortsetzte, was bei den Dinukleotidanalysen dargelegt wurde:

a) starke Verschiebungen einzelner Nukleotidgehalte und

b) das Entstehen von zusätzlichen Verbindungen.

3.9. Ergebnisse der Tetranukleotidanalysen

Wie Abb. 9 zeigt, war es nicht möglich, alle vorhandenen Tetranukleotide sauber voneinander zu trennen. Da auch hier das unter 3.8. in der Vorbemerkung Gesagte zutrifft und zusätzlich mit weniger Radioaktivität gearbeitet werden mußte (Tab. 4, Tab. 5) (bei vergrößerter Anzahl der Verbindungen), wird auf die Wiedergabe der Ergebnisse der Tetranukleotidanalysen verzichtet. Die in Abb. 9 den Schwärzungsbereichen zugeordneten Verbindungen wurden nicht eigens analysiert, sondern aufgrund von Laufgeschwindigkeiten relativ zu X.C.F.F. nach (1) festgelegt.

Die ungenügende Auftrennung der Analysen verhinderte auch das Erkennen von Zusatzverbindungen wie bei den Di- bzw. Trinukleotiden.

3.10. Autoradiogramme der Plattengelelektrophoresen

Abb. 10 zeigt die Auftrennung der durch die T_1-RNAse erhaltenen Elutionsbereiche RI und RII von 18S und 28S rRNS.

Die gestrichelt eingezeichneten Banden von 18 RII und 28 RII sind wegen zu geringer Aktivitäten auf dem Photo des Autoradiogrammes nur schwach zu erkennen.

Die eingezeichneten Banden von 18 RI und 28 RI sollten die Penta- bis Decanukleotide (auf -Gp endend) sein, was ebensowenig nachgeprüft wurde wie die Länge der Oligonukleotide der Rest II-Auftrennungen, die höhere Oligonukleotide enthalten sollten.

Abb. 26 zeigt die Autoradiogramme der Versuche III, IV und IX in Verbindung mit dem Versuch Ic fur 18RI und 28 RII. Bei 18 RI erkennt man eine Erhöhung des Gehaltes von Hepta- bis Noanukleotiden, die einhergeht mit der Verringerung der Penta- und Hexanukleotide im Versuch IV und - in weniger ausgeprägter Form - auch im Versuch IX. Diese Beobachtung konnte bei der Reihe 28 RII nicht eindeutig bestätigt werden.

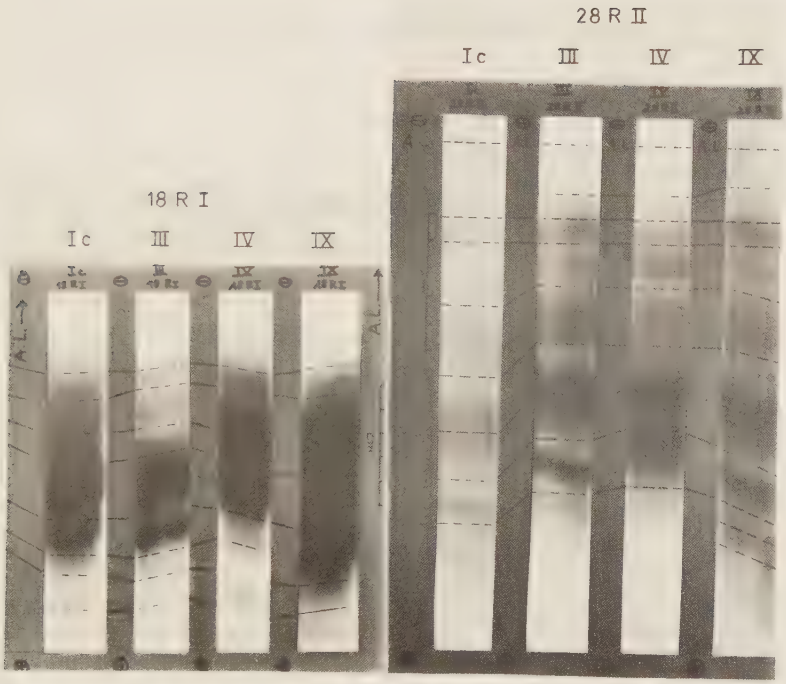


Abb. 26: Autoradiogramme von 18 RI sowie 28 RII der im Text genannten Versuche; Elektrophoresebedingungen s. 2.2.10; A.L. = Auftragslinie; Dauer der Exponierung bei - 18°C: 3 Wochen.

3.11. Ergebnisse eines kinetischen Experimentes (X)

Um einen weiteren Anhaltspunkt für die Wirkungsweise des Karzinogens und die Stabilität von Veränderungen in der rRNS-Feinstruktur zu erhalten, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Ratten nach einer

Fütterungsdauer mit NNM von 131 Tagen (insgesamt 240 mg/Ratte) für 48 Tage wieder auf Wasser umgestellt wurden. Die Ergebnisse dieses Versuches sind also vergleichbar dem Versuch IX und wurden hier zusammen mit den Ergebnissen der Versuche I und IX (bzw. VIII bei den Daten des p-RNAse-Abbaus dargestellt.

Die alkalischen Hydrolysen ergaben folgende Werte:

	18 A.H.				28 A.H.			
	Cp	Ap	Gp	Up	Cp	Ap	Gp	Up
I	26,6	22,0	30,8	20,6	31,6	18,7	32,3	17,6
IX	26,1	22,7	30,6	20,7	29,7	18,9	33,9	17,4
X	26,3	21,2	31,5	21,0	28,5	18,3	37,2	16,0

Die Mononukleotide des p-RNAse-Abbaus:

	18 Mono P		28 Mono P	
	Cp	Up	Cp	Up
I	58,5	41,5	69,7	30,3
VIII	58,7	41,3	68,0	32,0
X	65,1	34,9	55,6	44,4

DEAE Sephadexsäulen des T_1-RNAse-Abbaus

18 T_1

	Mono	Di	Tri	Tetra	RI	RII
I	10,0	12,0	13,3	13,0	38,4	10,0
IX	10,4	11,2	13,2	12,2	39,9	13,1
X	9,7	11,5	12,7	12,3	42,9	10,9

28 T_1

	Mono	Di	Tri	Tetra	RI	RII
I	11,4	13,9	13,6	11,4	34,0	15,6
IX	12,2	16,0	13,9	10,6	33,1	14,1
X	8,3	13,5	13,0	10,6	35,4	19,2

DEAE Sephadexsäulen des p-RNAse-Abbaus:

18S rRNS

	Mono	Di	Tri	Tetra	RI	RII
I	24,3	16,5	19,0	12,2	23,9	4,1
VIII	23,0	18,0	19,1	12,1	21,9	5,9
X	24,8	16,3	17,4	11,8	24,3	5,3

28S rRNS

	Mono	Di	Tri	Tetra	RI	RII
I	24,8	16,5	16,3	12,0	23,2	7,2
VIII	22,1	18,3	17,4	12,6	21,5	8,2
X	24,1	15,9	16,4	12,2	24,3	7,1

Dinukleotide des T_1-RNAse-Abbaus:

18 Di T_1				28 Di T_1		
	CG	AG	UG	CG	AG	UG
I	40,0	29,8	30,2	45,8	28,1	26,1
IX	39,7	32,0	28,3	50,4	26,3	23,3
X	40,0	30,6	29,4	45,0	27,7	27,2

Dinukleotide des p-RNAse-Abbaus:

18 Di P					28 Di P			
	AC	GC	AU	GU	AC	GC	AU	GU
I	23,2	35,1	19,3	22,5	18,7	48,6	10,7	22,0
VIII	23,2	39,8	15,6	21,4	19,1	45,0	16,6	19,3
X	22,0	35,8	20,2	22,1	17,7	46,9	11,6	23,8

Aufgrund dieser Befunde könnte der Eindruck entstehen, daß durch NNM-Gaben gesetzte Veränderungen in der 18S und 28S rRNS nach Absetzen des Karzinogens wieder rückläufig sind. Dieses ist jedoch aus zwei Gründen sicher nicht zutreffend:

1) Wie gezeigt werden konnte, besitzen die Veränderungen auch unter fortwährender Gabe von NNM eine rückläufige Tendenz. Ein Versuch von der Art des Versuches X hätte zu einem kurzfristigerem Fütterungszeitpunkt mehr Klarheit geschaffen.
2) Die geringen Unterschiede zwischen den Versuchen I und IX sowie die rückläufige Tendenz der Veränderungen zu früheren Fütterungszeitpunkten zeigen an, daß schon frühzeitig neben den normalen Leberzellen auch Krebszellen untersucht wurden (s. Diskussion 4.2.5.).

3.12. Isolierung von unbekannten Nukleotiden und deren spektrale Analyse

Die in Tab. 10, Abb. 22 und Abb. 23 geschilderten Nukleotidbereiche 1-3 der 18S und 28S rRNS-Dinukleotide des p-RNAse-Abbaus wurden zur weiteren Charakterisierung durch Spektralanalyse in einer größeren Menge gewonnen (s. 3.1.). Die rRNS der Tiere, die keine Markierung mit ^{32}P erhalten hatten, wurde nach Abtrennung der 5S rRNS und des Bereiches MII mit p-RNAse abgebaut und über eine DEAE Sephadexsäule

aufgetrennt. Die Dinukleotide wurden dann entsalzt und einer Hochspannungspapierelektrophorese unterworfen (Auftragslinie 30 cm). Die Auswertung des Papiers erfolgte durch Reflektionsmessung im Spektrodensitometer. Nach Elution der Nukleotidbereiche 1-3 sowie (zur Kontrolle) von AC, AU und GC wurden Spektren bei drei pH-Werten durchgeführt. Da die Angabe aller Daten dieser Spektren, die nach alkalischer Hydrolyse der Substanzen (1,0 mKOH, 80°C, 1 h) noch einmal wiederholt wurden, hier zu weit führen würde, sind in Tab. 13 lediglich die spektralen Daten der N.B. 1-3 und von GpCp aufgenommen.

Wie schon unter 3.7.2. beschrieben und in Abb. 22 dargestellt, besteht der N.B. 1 aus zwei elektrophoretisch trennbaren Nukleotidbereichen. Durch den Verzicht auf die "moving up"-Technik (und damit Verlust von GU) bei der Papierelektrophorese des unmarkierten Dinukleotidmaterials, konnten beide Bereiche voneinander getrennt und isoliert werden.

Wie Tab. 13 zeigt, weisen beide Materialien (N.B. 1a und N.B. 1b) unterschiedliche spektrale Daten auf. In Abb. 27 sind die Spektren der in Tab. 13 aufgeführten Substanzen wiedergegeben, in Abb. 28 die Spektren der Substanzen nach der alkalischen Hydrolyse mit KOH. Die Daten der N.B. 1a - 3 gestatteten erwartungsgemäß keine klare Zuordnung zu den "normalen" Dinukleotiden (30).

pH 1,0 (0,1) mHCl)

	λmax.	λmin.	240	250	(nm) 270	280	290
N.B. 1a	275	236	0,69	0,86	1,00	0,97	0,67
n.A.H.	275	236	0,74	0,90	0,98	0,94	0,64
N.B. 1b	278	242	0,46	0,59	1,50	1,67	1,15
n.A.H.	277	241	0,52	0,66	1,38	1,49	1,04
GC	276	233	0,47	0,78	1,07	1,09	0,76
n.A.H.	276	232	0,46	0,78	1,06	1,09	0,75
Literatur (30)	276	233	0,43	0,76	1,08	1,10	0,76
N.B. 2	262	235	0,64	0,84	0,95	0,81	0,56
n.A.H.	262	233	0,63	0,85	0,94	0,77	0,49
N.B. 3	258	232	0,70	0,88	0,81	0,45	0,21
n.A.H.	259	232	0,72	0,90	0,80	0,45	0,19

pH 7,0 (Phosphatpuffer 1/15 m)

	λmax.	λmin.	240	250	(nm) 270	280	290
N.B. 1a	256	233	0,95	1,03	0,92	0,68	0,34
n.A.H.	255	234	0,93	1,05	0,90	0,69	0,30
N.B. 1b	269	250	1,01	0,91	1,11	0,86	0,34
n.A.H.	267	246	0,91	0,90	1,04	0,77	0,28
GC	255	224	0,85	1,02	0,95	0,71	0,29
n.A.H.	255	226	0,88	1,05	0,97	0,76	0,28
Literatur (30)	255	224	0,83	1,01	0,94	0,70	0,27
N.B. 2	256	233	0,85	0,98	0,88	0,63	0,29
n.A.H.	256	232	0,80	0,97	0,86	0,60	0,50
N.B. 3	258	233	0,67	0,89	0,82	0,47	0,20
n.A.H.	256	234	0,66	0,91	0,81	0,47	0,18

pH 12,0 (0,01 n NaOH)

	λ max.	λ min.	240	250	270	280	290
N.B. 1a	267	239	0,94	0,96	0,99	0,75	0,34
n.A.H.	265	248	1,02	0,98	0,97	0,75	0,42
N.B. 1b	270	252	1,04	0,92	1,11	0,87	0,38
n.A.H.	269	252	1,10	0,95	1,07	0,84	0,42
GC	267	231	0,73	0,89	1,03	0,72	0,20
n.A.H.	267	231	0,77	0,89	1,03	0,70	0,17
Literatur (30)	267	231	0,71	0,88	1,04	0,70	0,17
N.B. 2	262	240	0,91	0,95	0,93	0,64	0,34
n.A.H.	262	248	1,02	0,97	0,93	0,67	0,38
N.B. 3	259	243	0,89	0,93	0,84	0,48	0,24
n.A.H.	259	247	1,02	0,97	0,86	0,57	0,37

Tabelle 13: Spektrale Daten der Nukleotidbereiche 1a bis 3 sowie von GpCp (zusammen mit den Literaturwerten).
λ max., λ min.: Maximum bzw. Minimum des Spektrums (in nm); alle anderen Werte sind Extinktionsverhältnisse bei der angegebenen Wellenlänge relativ zu 260 nm.

n.A.H. = nach der alkalischen Hydrolyse

pH 1,0 (0,1) mHCl)

	λmax.	λmin.	240	250	(nm) 270	280	290
N.B. 1a	275	236	0,69	0,86	1,00	0,97	0,67
n.A.H.	275	236	0,74	0,90	0,98	0,94	0,64
N.B. 1b	278	242	0,46	0,59	1,50	1,67	1,15
n.A.H.	277	241	0,52	0,66	1,38	1,49	1,04
GC	276	233	0,47	0,78	1,07	1,09	0,76
n.A.H.	276	232	0,46	0,78	1,06	1,09	0,75
Literatur (30)	276	233	0,43	0,76	1,08	1,10	0,76
N.B. 2	262	235	0,64	0,84	0,95	0,81	0,56
n.A.H.	262	233	0,63	0,85	0,94	0,77	0,49
N.B. 3	258	232	0,70	0,88	0,81	0,45	0,21
n.A.H.	259	232	0,72	0,90	0,80	0,45	0,19

pH 7,0 (Phosphatpuffer 1/15 m)

	λmax.	λmin.	240	250	(nm) 270	280	290
N.B. 1a	256	233	0,95	1,03	0,92	0,68	0,34
n.A.H.	255	234	0,93	1,05	0,90	0,69	0,30
N.B. 1b	269	250	1,01	0,91	1,11	0,86	0,34
n.A.H.	267	246	0,91	0,90	1,04	0,77	0,28
GC	255	224	0,85	1,02	0,95	0,71	0,29
n.A.H.	255	226	0,88	1,05	0,97	0,76	0,28
Literatur (30)	255	224	0,83	1,01	0,94	0,70	0,27
N.B. 2	256	233	0,85	0,98	0,88	0,63	0,29
n.A.H.	256	232	0,80	0,97	0,86	0,60	0,50
N.B. 3	258	233	0,67	0,89	0,82	0,47	0,20
n.A.H.	256	234	0,66	0,91	0,81	0,47	0,18

pH 12,0 (0,01 n NaOH)

	λmax.	λmin.	240	250	270	280	290
N.B. 1a	267	239	0,94	0,96	0,99	0,75	0,34
n.A.H.	265	248	1,02	0,98	0,97	0,75	0,42
N.B. 1b	270	252	1,04	0,92	1,11	0,87	0,38
n.A.H.	269	252	1,10	0,95	1,07	0,84	0,42
GC	267	231	0,73	0,89	1,03	0,72	0,20
n.A.H.	267	231	0,77	0,89	1,03	0,70	0,17
Literatur (30)	267	231	0,71	0,88	1,04	0,70	0,17
N.B. 2	262	240	0,91	0,95	0,93	0,64	0,34
n.A.H.	262	248	1,02	0,97	0,93	0,67	0,38
N.B. 3	259	243	0,89	0,93	0,84	0,48	0,24
n.A.H.	259	247	1,02	0,97	0,86	0,57	0,37

Tabelle 13: Spektrale Daten der Nukleotidbereiche 1a bis 3 sowie von GpCp (zusammen mit den Literaturwerten).
λ max., λ min.: Maximum bzw. Minimum des Spektrums (in nm); alle anderen Werte sind Extinktionsverhältnisse bei der angegebenen Wellenlänge relativ zu 260 nm.

n.A.H. = nach der alkalischen Hydrolyse

CpCp zu Cp entsprach dem Übergang der Daten von N.B. 1b zu N.B. 1b nach der alkalischen Hydrolyse.

6) N.B. 2 ließ sich keinem bekannten Dinukleotid zuordnen.

7) N.B. 3 entsprach in den Werten von λ max. und λ min. am ehesten dem Dinukleotid UpUp; die Werte für die Extinktionsverhältnisse von N.B. 3 verliefen zu den Werten von UpUp jedoch nur in etwa parallel, so daß auch hier keine eindeutige Zuordnung möglich war.

Damit ergab sich die Vermutung, daß die in den Nukleotidbereichen 1a - 3 vorhandenen Dinukleotide eine chemische Veränderung erfahren haben mußten, die eine Erhöhung der Extinktion und damit eine Verschiebung besonders der Minima in den Spektren bewirkte. Es wurde gezeigt, daß N.B. 1b ein ähnliches spektrales Verhalten aufwies wie CpCp, N.B. 3 im spektralen Vergleich dem Dinukleotid UpUp sehr nahe kam und N.B. 1a ein typisches Spektrum von GpCp ergab. N.B. 2 zeigte ein keinem Dinukleotid analoges Verhalten, und es ist daher naheliegend, hier - ebenso wie bei N.B. 3 - ein Gemisch zweier oder mehrerer Verbindungen zu vermuten.

3.13. Ergebnisse der Analysen von einzelnen Nukleotidbereichen der Dinukleotidauftrennungen

Wie im Ergebnisteil schon erwähnt und in Abb. 13 dargestellt, wurden von vielen elektrophoretisch aufgetrennten Nukleotiden alkalische Hydrolysen und Hydrolysen mit P.D.E. durchgeführt.

Alle Dinukleotide und die meisten Trinukleotide wurden auf diese Weise charakterisiert. Einer gleichartigen Analyse der Tetranukleotide standen die ungenügende Trennschärfe bei der Ionophorese und die zu geringe Radioaktivität nach den Autoradiogrammen im Wege.
Interessant bei diesem Analysenweg war weniger das Verhalten der "normalen" Nukleotide, auf deren analytische Bestätigung nicht weiter eingegangen werden soll, als die elektrophoretischen Auftrennungen der alkalischen und enzymatischen Hydrolysate der Nukleotidbereiche beider enzymatischer Abbauwege. Es zeigte sich nämlich, daß alle Nukleotidbereiche der Dinukleotidauftrennungen beiden Abbauwegen widerstanden und elektrophoretisch als eine Verbindung bestehen blieben. Dieses heißt jedoch nicht, daß die Phosphodiesterbindung tatsächlich bestehen geblieben sein mußte. Bei Dinukleotiden mit zwei gleichartigen Basen (z.B. CpCp) hätte eine Aufspaltung in Mononukleotide aufgrund sehr ähnlicher Laufgeschwindigkeiten nicht entdeckt werden können.
Da nach 3.12. die Nukleotidbereiche 1a und 2 des p-RNAse-Abbaus nicht aus nur einer Basenart bestanden, hätte eine Aufspaltung erkannt werden müssen.

3.14. Fehlerbetrachtung

3.14.1. Enzymatische Arbeiten

Wie bei allen enzymatischen Arbeiten so mußte auch in dieser Arbeit darauf geachtet werden, daß nicht anstelle der Untersuchung der N-Nitrosomorpholinabhängigkeit von 18S und 28S rRNS-Strukturveränderungen unfreiwillig die der enzymatischen Kinetik durchgeführt wurde.
Daher wurden im Abstand von jeweils sechs Monaten drei Kontrollversuche durchgeführt, deren Ergebnisse eine sehr zufriedenstellende Übereinstimmung zeigten. Außerdem wurden die Versuche II bis IX nicht in dieser Reihenfolge, sondern statistisch variiert durchgeführt. Unterschiede der Aktivitäten der benutzten Enzyme als Ursache der dargestellten Veränderungen konnten somit ausgeschlossen werden.

3.14.2. Zufuhr des Karzinogens

Es bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten den Versuchstieren das gewählte Karzinogen zuzuführen:

a) Schlundsondenfütterung

b) Trinkwasserfütterung.

Abb. 14 zeigt eine für einen biologischen Versuch recht geringe Abweichung der einzelnen Versuchspunkte von der Linearität der NNM-Aufnahme der Versuchstiere, so daß die in vielen Fällen geübte Trinkwasserfütterung (z.B. 27) zweckmäßig erschien. Der Lichtempfindlichkeit und der begrenzten chemischen Stabilität des Karzinogens wurde Rechnung getragen (31, 14).

3.14.3. Aufarbeitung und Analytik

Bei Präparation und Analyse der rRNS-Untereinheiten ergaben sich zwei kritische Punkte:

a) die Isolierung der 18S rRNS bei längerer Fütterungsdauer mit dem Karzinogen und

b) die Entsalzung der Nukleotidelutionsbereiche nach den DEAE Sephadexauftrennungen.

Alle benutzten Glasgeräte, Lösungen und das dest. Wasser wurden autoklaviert und - wo irgend möglich - Einweggefäße aus Kunststoff verwendet. Durch die Prüfung auf Reinheit und Intaktheit der rRNS-Untereinheiten mit der P.A.A.-Rundgelelektrophorese wurde sichergestellt, daß nur homogene Substanzen analysiert wurden. Die Entsalzungsvorgänge der Nukleotidelutionsbereiche über DEAE Sephadex A 25 HCO_3^- Form wurden durch Radioaktivitätszählungen verfolgt. Die Bindung der Dinukleotide und höheren Nukleotide an das Ionenaustauschgel verlief unproblematisch. Für die Entsalzung der Mononukleotide mußten die Spülungsvorgänge gegenüber den Literaturangaben (5, 6, 33) variiert werden (s. 2.2.7.). Eine Prüfung auf Materialselektion von nicht gebundenen Radioaktivitäten verlief negativ.

Das Entfernen der 2,0 m NH_4HCO_3-Elutionslösung durch Gefriertrocknungen und Trocknungen im Vakuum auf µl-Volumina war langwierig - und - entgegen anderen Angaben (6) - nie ganz vollständig, was die Trennschärfe der Ionophoresen

etwas beeinträchtigte.

Der Vergleich der Laufstrecken von X.C.F.F. (mit den Substanzen) und des Farbstoffes (ohne Beeinflussung durch die Substanzen) auf dem DEAE Papier ergab bei einer Laufstrecke von 22 cm bis 37 cm nur eine Abweichung von 0,5 cm. Von diesen geringen Salzmengen unbeeinflußt waren die Mono- und Dinukleotidanalysen auf 3MM Papier.

4. Diskussion

4.1. Ergebnisse

4.1.1. Verlauf der spezifischen Aktivitäten

Wie schon unter 3.3. hervorgehoben wurde, ist die Diskussion eines so groben Parameters wie des der spez. Aktivität für sich allein problematisch. Der Verlauf der spez. Aktivitäten wird von Nemoto und Nakayama (16) am Beispiel des Dimethylnitrosamins für den Zeitraum bis zu 30 Tagen bestätigt. In dieser Arbeit wurde nun dargestellt, daß das erste Maximum bei ca. 20-25 Tagen Fütterungsdauer gefolgt wurde von einer Absenkung der spez. Aktivität bis zu einer Fütterungsdauer von ca. 60 Tagen, um dann ein neues Maximum zu erreichen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Verlauf der spez. Aktivitäten für 18S und 28S rRNS nicht identisch war. Sowohl Höhe als auch Verlauf der spez. Aktivitäten war unterschiedlich. Nimmt man den Verlauf der spez. Akt. von 5S rRNS, der dem von M II parallel verlief, als Bestätigung der nicht nukleolaren Herkunft dieser beiden Ribonukleinsäurebereiche, dann stützen

die oben genannten Unterschiede der 18S und 28S rRNS die von Tiollais u. Mitarb. (33) diskutierte These der unterschiedlichen Herkunft beider Ribonukleinsäuren.
Zumindest harmonieren die obigen Ergebnisse nicht mit der Vorstellung, daß beide rRNS-Arten aus einer Vorstufen-RNS entstehen.

4.1.2. Ergebnisse der Mononukleotidanalysen und der alkalischen Hydrolysen

Die in Tab. 2a-e dargestellten Werte entsprachen für 18S und 28S rRNS den Literaturwerten der Mononukleotidzusammensetzungen dieser Ribonukleinsäuren.
Dieses steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Dinukleotidanalysen und der dort dargestellten Nukleotidbereiche (3.7.) (3.12.), da nicht hydrolysierbare Dinukleotide entweder mit den Mononukleotidbereichen gelaufen wären (z. B. CpCp) oder - unter der Annahme der statistischen Bildung dieser Dinukleotide - ein Effekt auf die Bruttozusammensetzung nicht zu erwarten gewesen wäre.
Die Bewertung der Versuche zur Abtrennung "alkalistabiler" Dinukleotide der alk. Hydrolysate durch Ionenaustauschsäulen wurde bereits unter 3.6.3. gegeben.
Die Daten der Mononukleotide des p-RNAse-Abbaus (Tab. 3, Abb. 17) können durch die Werte der Tab. 5 nicht erklärt werden. Eine Überschlagsrechnung ergibt, daß eine Verringerung um 5 % Cp in den Mononukleotiden des p-RNAse-Abbaus eine Minderung des Mononukleotidanteils der Säulenelution von

0,7 - 0,9 % ausmachen würde. Eine Entsprechung der Tab. 3 und Tab. 5 war daher nicht zu erwarten.
Für die Verringerung des Cp-Gehaltes in beiden Ribonukleinsäuren für den Fütterungszeitraum bis ca. 60 Tagen (mit einem Maximum bei ca. 40 Tagen) bestehen die Erklärungsmöglichkeiten in:

a) einer chemischen Basenumwandlung der Matrize oder des Transkriptionsproduktes (was aber nicht zutreffen dürfte) und

b) Vernetzungseffekten ("cross-linking") mit Cp oder einem anderen Nukleotid, wodurch der geringere Cp-Gehalt bei den Mononukleotiden zu erklären wäre. Für diese Deutung gibt es besondere Hinweise (s.u.).

4.4.3. Ergebnisse der Di- und Trinukleotidanalysen

Das hervorstechende Merkmal der Dinukleotidanalysen beider Abbauwege war das Erscheinen von vier (T_1-RNAse) und drei (vier) (p-RNAse) neuen Radioaktivitätsbereichen gegenüber dem Kontrollwert nach der Hochspannungspapierelektrophorese, hier Nukleotidbereiche genannt.
Die Nukleotidbereiche des Dinukleotidmaterials (p-RNAse) wurden in unmarkierter Form in solchen Mengen hergestellt, daß Spektren angefertigt werden konnten (3.12). Aus diesen ließ sich ableiten, daß es sich wahrscheinlich um Dinukleotide handelte, die untypisch für die Spaltungsbedingungen waren

und/oder eine geringere Ionisierbarkeit (Laufgeschwindigkeit) als die Vergleichsverbindungen besaßen.
Die chemische Natur dieser Dinukleotide konnte nicht völlig geklärt werden, jedoch ergaben sich aus der alkalischen und enzymatischen Nichtangreifbarkeit (3.13) einige gewichtige Hinweise auf die Art dieser Verbindungen.
Die Nukleotidbereiche bestanden auf jeden Fall aus Dinukleotiden (spektr. Analyse, DEAE Sephadexsäule, NNM-Abh., kein stöchiometrischer Zerfall in Mononukleotide). Da jedoch die Spektren nicht vollkommen identisch waren, mit denen bekannter Dinukleotide, die Laufgeschwindigkeit (Ionisierbarkeit der Basen) verändert war gegenüber den "normalen" Dinukleotiden und außerdem die oben genannte Stabilität gegen Alkali- und P.D.E.-Behandlung vorlag, drängte sich zur Erklärung der Struktur dieser Verbindungen eine Möglichkeit auf: die Basenvernetzung ("cross-linking").

Über die Natur des Vernetzers ließ sich noch keine Aussage herleiten, ein Vorschlag wird später erörtert. Es erhob sich nun die Frage, ob die Spezifität der zur Analytik benutzten Enzyme durch die Vernetzung gelitten hatte oder erhalten geblieben war. Die DEAE Sephadexsäulenprofile, die alleinige Anwesenheit von Gp in 18 und 28 Mono T_1 sowie Cp und Up in 18 und 28 Mono P und die überwiegende Produktion von "normalen" Dinukleotiden sprachen für die Erhaltung der Enzymspezifitäten. Daraus ergaben sich für die Natur der

Nukleotidbereiche folgende Überlegungen:

a) Sie könnten einmal "normale" Dinukleotide, die in ihrer Laufgeschwindigkeit durch Bindung der ionisierbaren Gruppen an den Vernetzer verändert wurden, sowie

b) Dinukleotide enthalten, die durch Vernetzung der durch das benutzte Enzym entstandenen Mononukleotide gebildet wurden.

Theoretisch ergäben sich dann acht Möglichkeiten für die veränderten Dinukleotide des Abbaus mit p-RNAse und vier für veränderte Dinukleotide nach Abbau mit T_1-RNAse. Die Anzahl dieser möglichen Verbindungen würde sich noch beträchtlich erhöhen, wenn die Vernetzungspunkte an den Basen nicht einheitlich wären, also ionisierbare und nicht ionisierbare Gruppen einbezogen wären.
Es erscheint daher möglich, daß einerseits in ihrer Laufgeschwindigkeit etwas veränderte Dinukleotide nicht erkannt wurden, andererseits [illegible] ähnliche Laufgeschwindigkeiten besaßen, also Nukleotidgemische elektrophoretisch homogen erschienen.
Die Veränderungen einzelner Gehalte "normaler" Dinukleotide, die alkalisch hydrolysierbar waren und daher enzymatisch gespalten sein müssen, können nur durch Veränderungen der Struktur (DNS) erklärt werden. Der Angriff der aus den Karzinogenen gebildeten Carboniumionen auf die DNS ist nach Rajewsky u. Orth auch in Strukturen der Basenpaarung möglich (50).
Der Effekt des Karzinogens auf die DNS - hier für das NNM die postulierte Basenvernetzung - müßte bei der Transkription einerseits in Fehlablesungen (Längsvernetzung), andererseits in der Bildung von Bruchstücken (Quervernetzung) bestehen.
Da hier nur die in den fertigen Ribosomen vorhandene RNS untersucht wurde, kann zur zweiten Möglichkeit nicht Stellung genommen

werden. Bei der Vielzahl der Dinukleotidveränderungen sind Fehlablesungen jedoch wahrscheinlich. Hierzu paßt die Beobachtung von Stewart u. Magee (36), daß NNM-Gaben in Rattenlebern eine Vergrößerung der Monosomenfraktion bewirkt. Fehlablesungen und eine dadurch bedingte veränderte Sekundärstruktur der rRNS-Untereinheiten könnten der Grund für dieses Verhalten sein.

Von diesen Ergebnissen ausgehend müssen also zwei Effekte e i n e r Wirkungsweise des Karzinogens auf die zellulären Nukleinsäuren unterschieden werden:

a) die Vernetzung von Nukleinsäurebasen der DNS, die sich durch Bruchstückbildung und/oder Fehlablesungen bei der Synthese des Genproduktes zu erkennen geben müßte (Veränderungen der Nukleotidgehalte) und

b) die Vernetzung des Genproduktes (Entstehen der anormalen Nukleotidbereiche).

Da nicht bekannt ist, ob die Assoziation der Nukleinsäuren mit Proteinen die Vernetzung stört oder unmöglich macht, kann über den Zeitpunkt der vernetzenden Reaktion keine Aussage gemacht werden. (In Analogie zu Raj. u. Goth sollte Basenpaarung in dieser Reaktion nicht stören.) Es ist jedoch zu vermuten, daß die Basenvernetzung der RNS eher während der Synthese und der Spaltungsvorgänge der Vorstufen-RNS abläuft, als in den intakten Ribosomen. Analog müßten aktivere DNS-Bereiche der vernetzenden Reaktion stärker ausgesetzt sein als solche, deren Information in dem betreffenden Organ nicht benötigt wird (48, 49). Die unter 3.7.1. und 3.7.2. festgestellten detaillierten Veränderungen der Dinukleotide würden beide vermuteten Effekte des Karzinogens (auf die DNS und die RNS) beinhalten. Der Anteil der beiden Effekte ist nicht faßbar.

Die Trinukleotidveränderungen und das Erscheinen von "Extraspots"

ergänzen die Erklärung für die Dinukleotidveränderungen.

4.1.4. Ergebnisse der I.A.A.-Plattengelelektrophoresen

Wie die Darstellung der Plattengelelektrophoresen der Elutionsbereiche RI und RII zeigt (Abb.10, Abb.26), stieg der Gehalt an höheren Nukleotiden in RI (evtl. auch RII) an, zugleich nahm die Trennschärfe der Banden ab. Da die gewählten Bedingungen der Elektrophorese Oligonukleotide nach Kettenlänge von Bruchstücken mit e i n e m Gp-Rest trennen, wäre die Vernetzertheorie eine plausible Erklärung beider Tatsachen. Die Vernetzung würde größere Bruchstücke ergeben, und der in diesen Bruchstücken erhöhte Gehalt an Gp würde eine Bandenverbreiterung und damit eine geringere Trennschärfe bewirken.

4.1.5. Zeitabhängigkeit der durch NNM entstandenen Veränderungen und Wertung des kinetischen Versuches (X)

Die Abbildungen 17-23 haben die Gemeinsamkeit, daß die stärksten Veränderungen in einem Zeitraum von [illegible]-65 Tagen (insg. [illegible]-140 mg NNM [illegible]) zu verzeichnen waren. Die Versuche mit längerer Fütterungsdauer zeigten geringe oder keine Veränderungen.

Nach Bannasch und Müller (41) und eigenen Beobachtungen ist der morphologische Übergang von der geschädigten Leberzelle zur Krebszelle verbunden mit einer starken Erhöhung der AAS-Synthese und auf einen Zeitpunkt der NNM-Fütterung festzulegen, der bei ca. 80 Tagen liegt (41: 112 Tage). Abb. 16 deutet diese Entwicklung an

durch den erneuten Anstieg der spezifischen Aktivitäten. Es kann daher kein Zweifel bestehen, daß in den Versuchen VIII und IX die Wirkung des Karzinogens auf den bereits ausgebildeten Tumor untersucht wurde. Die entarteten Leberzellen scheinen jedoch - wie die anderen Zelltypen der Ratte- infolge Hydroxylasemangels nicht in der Lage zu sein, das NNM zu metabolisieren. Das ist die Folgerung aus der Rückläufigkeit der aufgezeigten Veränderungen bis zu dem oben genannten Zeitpunkt. In diesem Lichte war der Versuch X zu einem zu späten Zeitpunkt begonnen worden. Die geringen Unterschiede gegenüber I und IX gestatten daher keinen Einblick in die Kinetik der Veränderungen, die zu einem früheren NNM-Fütterungszeitraum nachgewiesen wurden.

4.2. Stoffwechsel des NNM und ein möglicher Bezug zu den vorgelegten Ergebnissen

Über den Stoffwechsel des NNM gibt es widersprüchliche Daten und mehrere Theorien.

Gefangen von den Ergebnissen der Versuche mit DMNA und DÄNA an Rattenlebern, die die entsprechenden Alkylierungsprodukte der Purinbasen (besonders Guanin) zeigten, wurde auch bei den heterozyklischen N-Nitrosoverbindungen nach Methylierungsprodukten und alkylierten Purinbasen gesucht. Die Theorie von Arcos (38), daß zyklische N-Nitrosoverbindungen gar nicht metabolisiert werden könnten, wurde bald verworfen. 1966 wurde von Lee und Lijinsky (37) 7-Methylguanin nach NNM-Gabe gefunden, jedoch lehnte 1973

dieselbe Gruppe (19) eine Alkylierung der Purinbasen unter NNM ab. Magee u. Mitarb. (35, 36) fanden in einer kinetischen Untersuchung mit ^{14}C-markiertem NNM sowohl 7-(2-Hydroxyäthyl) Guanin in der Rattenleber-RNS als auch N-Nitrosodiäthanolamin im Urin und beobachteten außerdem weitere fünf unbekannte radioaktive "Peaks" im DOWEX Säulen-Elutionsprofil des sauren Hydrolysates der RNS, die nicht einfache Alkylierungsprodukte der Purinbasen waren. Es gibt daher über die möglichen Stoffwechselwege des NNM keine einheitliche Vorstellung.

Alle Untersuchungen (z.B. 40--5) unterschieden sich jedoch nicht in der Methodik:

a) Isolierung der RNS aus Rattenlebern (46)

b) saure Hydrolyse der RNS mit 1,0 n HCl (1 h; 100°C) (18)

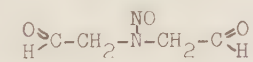
c) Auftrennung des Hydrolysates an DOWEX (2W x 50 o.ä.) Säulen mit einer linearen Gradientenelution (18)

Außerdem bleibt in allen Arbeiten, die mit radioaktiv markiertem NNM arbeiteten, die Tatsache unerklärt, warum die weitaus überwiegende Radioaktivitätsmenge der RNS in den Pyrimidinnukleotiden verblieb. Der geringste Teil (darüber gibt es keine quantitativen Angaben) erschien in dem Säulenelutionsprofil der Purinbasen dann an Stellen, die - abgesehen im Falle des 7-(2-Hydroxyäthyl)Guanin - nicht bekannten [illegible] zugeordnet werden konnten.

Es ist daher nicht erstaunlich, daß verschiedene Stoffwechselwege für das NNM vorgeschlagen wurden. Der Weg der β-Oxidation (in Analogie zum Fettsäureabbau), wie von Krüger (40) für Di-n-propyl- oder Di-n-butylnitrosamin diskutiert, kann für das NNM wegen fehlender Alkylierungsprodukte ausgeschlossen werden. Damit bleiben zwei weitere Stoffwechselwege, die beide zu bifunktionellen Molekülen führen würden:

a) die α-Hydroxylierung, nachfolgender Dehydrierung mit hydrolytischer Ringöffnung und Aldehydbildung auf der einen Seite des Moleküles und - wie für DMNA angenommen - Bildung einer Diazoverbindung und Bereitstellung eines Carboniumions auf der anderen Seite des Moleküles:

b) die Spaltung der Ätherbrücke durch Hydroxylasen zu N-Nitrosodiäthanolamin (β-Oxidation) mit nachfolgender Oxidation des zweiwertigen Alkohols zum Dialdehyd unter Erhaltung der N-Nitrosogruppe:



Wegen der wenigen sicher nachgewiesenen Metaboliten des NNM bzw. Purinderivate durch NNM ist es unmöglich, eine Entscheidung darüber zu treffen, welcher der beiden Wege wahrscheinlicher ist . Nimmt man nun die von Magee (35, 36) nachgewiesenen Substanzen N-Nitrosodiäthanolamin und 7-(2-Hydroxyäthyl)Guanin als

Kriterien (35, 36), so könnte der Abbauweg b) zwar den NNM-Metaboliten, nicht aber das Purinderivat erklären. Erst die Kombination beider Wege würde dann auch das 7-(2-Hydroxyäthyl) Guanin erklären können:

c) nach der Ätherspaltung zum N-Nitrosodiäthanolamin eine α-Oxidation und Zerfall in Glykolaldehyd (→Glyoxal), Bildung der Diazoverbindung und Zerfall in N_2 und das Carboniumion. Die Umsetzung mit Guanin ergäbe das obige Purinderivat.

Ausgehend von diesen Überlegungen ergäben sich für die gefundene Vernetzung von Nukleinsäurebasen aus c) zwei Bildungsmöglichkeiten:

1) unter Erhalt der N-Nitrosogruppe die zweimalige Bildung der Schiff'schen Base durch Umsetzung der Aldehydgruppen mit einem primären Amin (wie bei G, A und C vorhanden) und

2) Vernetzung durch das Carboniumion $\overset{O}{\underset{H}{\diagdown\!\!\diagup}}C\text{-}CH_2^+$ mit einerseits einem Ringstickstoffatom oder einer CH-Gruppe (50) und andererseits die Bildung einer Schiff'schen Base.

Hierzu muß erwähnt werden, daß beide Möglichkeiten die Bildung von vernetztem UpUp nicht erklären können, will man nicht die Möglichkeit der Aminalbildung hinzuziehen, die aber aus chemischen und sterischen Gründen unwahrscheinlich ist. Alle anderen Kombinationen von Basenvernetzungen sind jedoch theoretisch möglich, da die Bildung der Schiff'schen Basen eine unter physiologischen Bedingungen ablaufende Re-

aktion sein sollte (49). Sie ist abhängig von der Basizität des Amins, was den bevorzugten Angriff auf Cp bedeuten würde. Das könnte die beschriebene bevorzugte Bildung von vernetzten Cp-haltigen Dinukleotiden erklären.

Die durch die unter 2) aufgeführte Verbindung vernetzten Basen würden also durch eine N-C-Bindung (bzw. O-C-Bindung) und durch eine N=C-Bindung verbunden sein.

Durch die saure Hydrolyse der RNS wird nun einerseits die O-C-Bindung aufgebrochen (51) (was aber nicht den hohen Anteil der Radioaktivität in den Pyrimidinnukleotiden erklären würde), andererseits die mit Pyrimidinen vernetzten Purine (säurestabile N-C-Bindung) als "Pyrimidinnukleotide" von der DOWEX Säule eluiert werden, so daß nur die Purin-Purin-Vernetzungen und die durch die saure Hydrolyse entstandenen Purinspaltprodukte (anormal) im Elutionsprofil erscheinen würden. Dieses könnte die geringen Aktivitäten in diesem Bereich erklären.

Auch die Ergebnisse der Stoffwechselkinetik von Magee (35, 36) könnten mit dem vorgeschlagenen Stoffwechselweg des NNM erklärt werden. Das von Magee verwendete ^{14}C-markierte NNM wurde - wie in anderen Arbeiten auch - in sehr hohen Dosierungen appliziert, so daß es nicht erstaunen kann, daß nach 30 h 80% der eingesetzten Aktivität im Urin ausgeschieden wurde. Hierbei trat neben unverändertem NNM auch das oben bereits erwähnte N-Nitrosodiäthanolamin auf, was darauf hinweist, daß die Ringöffnung des NNM über die Sauerstoffbrücke (durch Hydroxylierung des ß-C-Atoms) offenbar kein geschwindigkeitsbegrenzender Schritt im Stoffwechsel des Karzinogens ist.

3% der eingesetzten Radioaktivität wurden innerhalb von 30 h (Magee) als $^{14}CO_2$ exhaliert. Im diskutierten Stoffwechselweg entstand pro Molekül NNM zu 50% Glykolaldehyd (bzw. Glyoxal) Nimmt man nun 20% des ^{14}C-markierten NNM als "aktives" Karzinogen an (weil es nach 30 h noch nicht wieder ausgeschieden worden war), so sollten 10% der eingesetzten Aktivität als leicht metabolisierbares C_2-Bruchstück vorliegen. Daß nur 1/3 dieser Menge in Form von $^{14}CO_2$ wiederkehrte, ist im Hinblick auf die vielfältigen Umsetzungsmöglichkeiten eines solchen Moleküles "in vivo" verständlich.
Die auf den dargelegten Ergebnissen bsierende Theorie der Basenvernetzung durch NNM, die in der Diskussion des NNM-Stoffwechsels aufgezeigte Möglichkeit zur Bildung von bifunktionellen Molekülen, der Vorschlag der Bildung einer Schiff'schen Base als weiterem Verknüpfungspunkt neben der O- und N-Alkylierung und der Versuch der Erklärung von widersprüchlichen Daten der Literatur durch die Vernetzertheorie mögen zu weiteren Untersuchungen des Stoffwechsels und der karzinogenen Wirkung heterozyklischer N-Nitrosoverbindungen anregen, bei denen u.a. eine kritische Prüfung der bislang angewendeten Methoden im Vordergrund stehen sollte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1) Weibliche Wistar-Ratten wurden kontinuierliche mit dem Karzinogen N-Nitrosomorpholin (NNM) gefüttert (10 mg/kg/Tag), zu verschiedenen Zeitpunkten der Fütterung wurden je vier Tiere durch Injektion von 20 mC ^{32}P (als Orthophosphat) 24 und 15 h vor der Tötung radioaktiv markiert und die ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNS) der Lebern isoliert. Nach Auftrennung der rRNS in die 18S und 28S rRNS-Untereinheiten wurden von diesen zwei enzymatische (T_1-RNAse, Pankreas-RNAse) und ein alkalisches Hydrolysat hergestellt. Die Hydrolysate wurden auf Ionenaustauschsäulen aufgetrennt (DEAE Sephadex A25), die Elutionsbereiche entsalzt und elektrophoretisch (Hochspannungspapier- Ionenaustausch- Plattengelelektrophorese) weiter aufgetrennt und quantifiziert. Methodische Fehler der Aufarbeitung und der analytischen Verfahren werden eingehend diskutiert.

2) Die Bruttobasenzusammensetzungen und die prozentualen Zusammensetzungen der Nukleotidelutionsbereiche der Ionenaustauschsäulen der durchgeführten Versuche ebenso wie die Auftrennungen der alkalischen Hydrolysate enthielten keine verläßlichen Hinweise für Unterschiede der rRNS-Untereinheiten. Dagegen konnten durch die Analyse der Nukleotidelutionsbereiche vielfältige Veränderungen aufgezeigt werden. Diese bestanden in

a) der Verringerung des Cp-Gehaltes der Mononukleotide des p-RNAse-Abbaus,

b) Veränderungen des Gehaltes einzelner Di- und Trinukleotide relativ zur Summe der betreffenden Di- und Trinukleotide bei beiden enzymatischen Abbauten und beiden rRNS-Untereinheiten,

c) dem Erscheinen unbekannter Verbindungen in den Nukleotidelutionsbereichen der Di- und Trinukleotide und

d) Veränderungen der Banden der P.A.A.-Plattengelelektrophoresen (Penta- bis Decanukleotide und Höhere Nukleotide) der T_1-RNAse-Abbauten.

3) Zwei der unbekannten Verbindungen konnten durch alkalische Hydrolyse und Phosphodiesterase-Abbau sowie durch Spektralanalyse als anormal vernetzte Dinukleotide erkannt werden. Im Lichte dieser Ergebnisse wurden alle anderen Befunde diskutiert.

4) Im Zusammenhang mit morphologisch faßbaren Effekten der NNM-Fütterung wird der Verlauf der spez. Aktivitäten und der Nukleotidveränderungen diskutiert.

5) Es wird versucht, die bekannten Daten der Stoffwechselkinetik und des Stoffwechsels des NNM in der Rattenleber zur Erklärung der gefundenen Basenvernetzung heranzuziehen. Hierbei wurde ein modifizierter Stoffwechselweg vorgeschlagen und dessen Auswirkungen auf die Nukleinsäurebausteine diskutiert. Die bisher von vielen Gruppen, welche sich mit der Wirkung des NNM befassen, angewendeten Methoden und die damit erreichten Ergebnisse werden kritisch diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

1) F. Sanger, G.G. Brownlee
J.Mol.Biol. 13 (1965) 373

2) L.M. Pener
L. Grossmann, K. Moldave (Eds.): Methods in Enzymology
Vol. 12, Part A (1967), 398-404

3) K. Higashi, S. Gotoh et al.
Biochem, Biophys. Acta 217 (1970) 408

4) H. Busch, K. Smetana
The Nucleolus, New York: Academic Press (1970)

5) C. Choi, H. Busch
J.Biol.Chem. 245 (1970), 1954-1961

6) S. Seeber, H. Busch
Z. Krebsforschung 78 (1972), 265-281

7) K. Higashi, T. Matsuhisa, S. Gotoh et al.
Biochem. Biophys. Acta 232 (1971) 352

8) J. Wikman, G. Quagliarotti, E. Howard, C. Choi, H. Busch
Canc. Res. 30 (1970), 2749-2758

9) J. Wikman, E. Howard, H. Busch
Canc. Res. 30 (1970), 773-775

10) R.A. Weinberg, S. Penman
J.Mol.Biol. 47 (1970), 169-178

11) H.C. Birnboim
Can.J.Biochem. 50 (1972), 993-1002

12) K. Higashi, S. Gotoh et al.
Biochem. Biophys. Acta 262 (1972) 320

13) M. Calvin
Radiation Research 50 (1972), 105-119

14) H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovic, D. Schmähl
Z. Krebsforschung 69 (1967), 106

[illegible]

Biochem. J. 81 (1962), 114

[illegible] N. Nemato, S. Takayama

Z. Krebsforschung 80 (1973), 113-125

[illegible]

[illegible]

[illegible] W. Lijinsky, A.E. Ross

J. Nat. Canc. Inst. 42 (1969), 1095

[illegible] W. Lijinsky, J. Keefer, I. Lee, A.E. Ross

Canc. Res. 33 (1973), 1634-1641

[illegible] P.W. Krüger, H. Ballweg, W. Maier-Borst

Experientia (Basel) 24 (1968), 592

[illegible] R. Schoenthal

Biochem. J. 114 (1969), 55

[illegible] K. Lee, W. Lijinsky

J. Nat. Canc. Inst. 37 (1966), 401

[illegible] A.W. Prestayo, M. Donato, H. Busch

J. Mol. Biol. 47 (1970), 505-515

[illegible] M. Hümpel, Diplomarbeit Tübingen (1970)

[illegible] R. De Maechter, W. Fiers in:

Methods in Enzymology Vol. XXI Part D (1971), 167 ff.

[illegible] R.M. Bock in:

Methods in Enzymology Vol. XII Part A (1967) 224

[illegible] H. Garcia, W. Lijinsky

Z. Krebsforschung 77 (1972), 253-261

28) H. Busch, K. Smetana in:
The Nucleolus, Academic Press (N.Y.) (1970) 225

29) A.S. Spirin, L.P. Gavrilova
in: The Ribosome, Springer Verlag (Heidelberg) (1969) 41

30) H.A. Sober (Herausgeber)
Handbook of Biochemistry 2nd Edition (1970) G 216

31) J. Sierra y Calejas, M. Hümpel
in Vorbereitung

32) W. Lijinsky,
Science 183 (1974) 368

33) P. Tiollais, F. Galibert, M. Boiron
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 68 (1971) 1117

34) G.W. Rushitzky, H.A. Sober
Biochem. Biophys. Acta 55 (1962) 217

35) P.N. Magee, A. Hawks, B.W. Stewart, P.F. Swann
in: Proceedings of the Fifth International Congress of
Pharmacology, San Francisco, Vol. 2 (1973) 140

36) B.W. Stewart, P.N. Magee
Biochem. J. 126 (1972) 21P - 22P

37) K.J.Lee, W. Lijinsky
J. Natl. Cancer Inst. 37 (1966) 401-407

38) J. Arcos, M. Arcos
Progr. Drug Res. 4 (1962) 314

39) R.Markham, J.D. Smith
Biochem. J. 52 (1952) 552

40) F.W. Krüger
Z. Krebsforschung 76 (1971) 145

41) P. Bannasch, H.A. Müller
Arzneimittelforschung 14 (1964) 805

42) P.N. Magee, T. Hultin
Biochem. J. 83 (1962) 106

43) P.N. Magee, K.J. Lee
Biochem. J. 91 (1964) 35

44) P.F. Swann, P.N. Magee
Biochem. J. 110 (1968) 39

45) P.F. Swann, P.N. Magee
10. International Cancer Congress, Houston (1970)
Abstracts S. 1

46) C. Kidson, K.S. Kirby, R.K. Ralph
J. Mol. Biol. 7 (1963) 312

47) Organikum (8.Auflage)
Berlin (1968) 370

48) N.M. Mironov, V.V. Adler
Biokhimiya 38 (1973) 992

49) F.J. Zieve
Mol. Pharmacol. 9 (1973) 658

50) R. Goth, M.F. Rajewsky
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 71 (1974) 639

51) O.M. Friedman, G.N. Mahapatra, B. Dash, R. Stevenson
Biochem. Biophys. Acta 103 (1965) 286

Lebenslauf

Am 12.6.1944 wurde ich als drittes Kind des Dr. med. Joachim Hümpel und seiner Frau Ilse geb. Brand in Lübeck geboren. Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Kaland-Volksschule in Lübeck. Anschließend wechselte ich in die dortige Oberschule zum Dom über, wo ich 1963 das Abitur ablegte. Im Sommersemester 1963 begann ich in Kiel das Studium der Humanmedizin und bestand im Sommersemester 1965 dort die ärztliche Vorprüfung. Der Wechsel des Studiums von der Medizin zur Biochemie führte mich im Wintersemester 1965 nach Tübingen, wo ich im April 1970 die Diplomprüfung für Biochemiker bestand. Ich beendete mein Studium mit der am M.P.I. für Virusforschung, Tübingen, bei Professor Dr.Dr. W. Frank angefertigten Diplomarbeit mit dem Titel:

"Fraktionierung von Ribonukleinsäuren aus synchronisierten Kulturen embryonaler Rattenzellen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese".

Von Dezember 1970 bis jetzt arbeitete ich unter der wissenschaftlichen Leitung von Professor Dr.Dr. W. Frank (M.P.I. für Virusforschung, Tübingen) im Institut für Medizinische Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Lübeck (Direktor: Prof. Dr. E. Harbers) an der vorliegenden Dissertation mit dem Thema:

"Untersuchungen über Nukleotidsequenzunterschiede von 18S rRNS und 28S rRNS aus Rattenleber bei der chemischen Karzinogenese durch N-Nitrosomorpholin".

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	H. Guglielmi, F. Schneider, G. Weitzel, H. Netter
Organische Chemie	: E. Bayer, E. Müller, M. Hanack
Anorganische Chemie	: W. Rüdorff
Physikalische Chemie	: H. Mauser, G. Kortüm
Pharmakologie	: H. Remmer
Physik	: W. Lochte-Holtgreven
Mathematik	: W. Schweizer
Physiologie	: H. Lullies, M. Monjé, D. Trincker
Anatomie	: A.v.Kügelgen, E. Lindner, W. Bargmann
Zoologie	: R. Siewing
Botanik	: F. Overbeck

DISSERTATIONSDRUCK Schadel & Wehle
86 Bamberg · Heiliggrabstraße 59 · Telefon: 0951/62857